

Über die Spaltwirkung von Diphthin auf IgG-Globulin von Mensch und Kaninchen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Heinrich Müller

aus Olpe/Westf.

Marburg 1968

Über die Spaltwirkung von Diphthin auf IgG-Globulin von Mensch und Kaninchen



INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Heinrich Müller

aus Olpe/Westf.

Marburg 1968



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 6. 2. 1968

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. R. Siegert

Referent: Privatdozent Dr. med. W. Schiff

Correferent: Prof. Dr. med. R. Siegert

Inhaltsverzeichnis

=====

	<u>Seite</u>
I. <u>Einleitung</u>	1
II. <u>Materialien und Methodik</u>	7
1. Gewinnung und Reinigung von Diphthin	7
2. Immunisierung von Menschen und Kaninchen zur Gewinnung von Immunsereen	7
3. Gewinnung und Reinigung von IgG-Globulin	8
4. Behandlung von IgG-Globulin mit Diphthin und Trennung der Diphthinfragmente	8
5. Serologischer Maustest	8
6. Agar- und Immunelektrophorese	9
7. Aminosäureanalyse	9
8. Kohlehydratbestimmungen	10
9. Bestimmung von freier N-Acylneuraminsäure	11
III. <u>Eigene Untersuchungen und Ergebnisse</u>	12
A. Spaltung von IgG-Globulin und Isolierung der Spaltstücke	12
B. Reaktionskinetik der IgG-Globulinspaltung mit Diphthin	15
C. Aminosäurenanalyse von nativem IgG-Globulin und dessen Fragmenten $^{di}F(ab)_2$ und ^{di}Fc	18
D. Bestimmung der proteingebundenen Kohlehydrate von IgG-Globulin und dessen Diphthinfragmenten	23
E. Zur Frage der Bedeutung der Neuraminidase aus Diphtheriebakterien-Kulturfiltraten für die Spaltung des IgG-Globulins	27
F. Beeinflussung des Diphthineffektes auf IgG- Globulin durch Cystein	29
G. Serologische Eigenschaften der $^{di}F(ab)_2$ - und ^{di}Fab -Fragmente vom IgG-Immunglobulin vom Mensch und Kaninchen	40
IV. <u>Besprechung</u>	48
V. <u>Zusammenfassung</u>	54
VI. <u>Literatur</u>	56



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

=====

Nach Beobachtungen von SEEMÜLLER, die er in den Jahren 1943 - 1954 veröffentlichte (Übersicht s. bei SCHIFF, 1964c), wird ein Versuchstier (z.B. Meerschweinchen), dem eine mehrfache Letaldosis eines artspezifischen Hämagglutinins bzw. Hämolysins (vom Kaninchen) injiziert wurde, vor dem Hämolysetod geschützt, wenn das Immunserum zuvor mit Diphtherie-(Roh)-Toxin inkubiert worden ist. (Zur Vermeidung der Giftwirkung des Di-Toxins auf Meerschweinchen muß dieser inkubierten Mischung von Hämagglutinin und Di-Toxin allerdings nachträglich Di-Antitoxin beigelegt werden.) SEEMÜLLER (1943, 1944, 1949) erklärte dieses nach ihm benannte Phänomen mit einer spezifischen Bindung und Neutralisierung des Hämagglutinins durch Di-Toxin. Diese angeblich spezifische Bindung zwischen Di-Toxin und Hämagglutinin ist jedoch in vitro weder als Antikörperhemmung noch als Toxinneutralisierung nachweisbar. Beide Vorgänge sollen sich erst im Organismus äußern, wobei in letzterem Fall SEEMÜLLER (1943, 1945, 1947, 1948, 1950, 1954) eine humorale Umwandlung von Hämagglutinin in Di-Antitoxin annahm.

Durch die Mitteilungen SEEMÜLLERs angeregt, untersuchten POULIK (1956, 1957, 1961), POULIK und SMITHIES (1958) die Wirkung von Di-Toxin auf einige isolierte Serumglobuline sowie auf Myelomseren vom Mensch. Hierbei stellte er unter anderem folgendes fest: Bei papierelektrophoretischen Untersuchungen zeigte sich, daß durch Behandlung mit Di-Toxin die einzelnen Fraktionen von Myelomseren einen auffallenden Verlust an proteingebundenem Kohlehydrat erlitten; beim γ -Globulin trat z.T. ein völliger Verlust auf. Ferner erschien im Pherogramm eine neue Fraktion, die mit geringerer Geschwindigkeit wanderte als das β -Globulin. In der Stärkeelektrophorese bewegte sich die neue Fraktion langsamer als die Bande des unbehandelten γ -Globulins. Wie sich zeigte, kam die neue Fraktion durch

Spaltung der γ -Globulinbande zustande. Vier von fünf weiteren Myelomseren verhielten sich ebenso; nur bei einem Serum war eine zusätzliche Fraktion nicht nachzuweisen. Bemerkenswerterweise waren diese Befunde nur mit Di-Rohtoxin, nicht jedoch mit hochgereinigtem Di-Toxin zu erheben. Nach POULIKS (1961) Ansicht beruht diese Wirkung des Di-Toxins einerseits auf einer in weniger gereinigten Chargen vorhandenen Neuraminidase (BLUMBERG und WARREN 1961; HEIDE und HAUPF 1962; JAMIESON und POULIK 1962; WARREN und SPEARING 1963), andererseits auf einem Gehalt des Myelom- γ -Globulins an Neuraminsäure (MÜLLER-EBERHARD und KUNKEL 1956). Eine andere Möglichkeit der Erklärung sah POULIK (1961, 1963) im eventuellen Vorkommen einer Peptidase, die an bestimmte Aminosäuren gebundene Zucker abzuspalten vermag.

Bei seinen Arbeiten zur Aufklärung des SEEMÜLLER-Phänomens konnte SCHIFF (1964e) aus Di-Bakterienkulturfiltraten ein als Diphthin bezeichnetes atoxisches, hitzestabiles Polypeptid (Mol.-Gew. ca. 15.000) isolieren. In eingehenden Untersuchungen wies er (SCHIFF 1964a,b,c und d) nach, daß diese Substanz für die von SEEMÜLLER gemachten tierexperimentellen Beobachtungen verantwortlich zu machen ist. Er vertrat die Ansicht, daß der von SEEMÜLLER beschriebenen intravitalem Antikörperhemmung nicht eine spezifische Bindung zwischen Hämagglutinin und Di-(Rein)Toxin, sondern eine unspezifische Bindung, d.h. Adsorption von Hämagglutinin an Diphthin zugrundeliegt. Mittels eines serologischen Maustests konnte er nämlich (SCHIFF, 1961) eine diphthinbedingte intravitale Titerreduktion von injiziertem heterospezifischem Hämagglutinin bzw. Hämolyisin (vom Kaninchen) feststellen, gleichgültig, ob Diphthin kurz zuvor, gleichzeitig oder nachträglich appliziert wurde. Diese Titerreduktion erklärte er mit einer kurzfristigen Eliminierung des sich bildenden Hämagglutinin/Diphthin-komplexes, analog den bei spezifischen Antigen/Antikörper-Komplexen gegebenen Verhältnissen. Der gleiche Vorgang spielte sich beim Hämolyse-schutzeffekt des Diphthins gegenüber einem artspezifischen Hämagglutinin (vom Kaninchen) ab.

Bei der Untersuchung der Frage, ob sich die Bindung zwischen Diphthhin und Hämagglutinin im Elektropherogramm der γ -Globuline äußert, fand SCHIFF (1964e) mittels Papier- und Agarelektrophorese eine Trennung der γ -Globulinbande in zwei Fraktionen, die in der Immunelektrophorese mit zwei sich überschneidenden Präzipitationslinien reagierten. Dieser Befund entsprach den oben erwähnten, von POULIK mit Di-Rohtoxin erzielten Ergebnissen. Da SCHIFF (1965) ebenfalls eine Auftrennung des γ -Globulins bei menschlichen Normal- und Myelomseren beobachtete, lag es nahe, den von POULIK als Neuraminidase- bzw. Peptidasewirkung von Di-Rohtoxin (bzw. weniger hochgereinigten Toxinpräparaten) gedeuteten Effekt auf einen vermutlichen Gehalt an Diphthhin (oder umgekehrt) zurückzuführen. Bei weiteren agar- und immunelektrophoretischen Versuchen konnte gegenüber sonstigen Human-Globulinen und gegenüber IgG-Globulinen anderer Spezies (z.B. Pferd, Rind und Schaf) kein Trenneffekt nachgewiesen werden. SCHIFF und WEISE (noch unveröffentlicht) stellten schließlich fest, daß dem Effekt des Diphthhins auf γ -Globuline eine Spaltung des γ G-Globulinmoleküls zugrundeliegt. Mit der näheren Untersuchung der erhaltenen Spaltstücke auf deren physikalische, chemische und biologische Eigenschaften befanden sie sich inmitten des großen Fragenkomplexes über die Struktur der γ G-Globuline.

Dieses Arbeitsgebiet hatte vornehmlich durch die Arbeiten von PORTER (1959) und EDELMAN (1959) neue Impulse erhalten und wird seither intensiv bearbeitet. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse führten zu einer konstruktiven Vorstellung vom Aufbau der Immunglobuline (= Ig-Globuline, d.h. der γ -Globuline), wobei das von PORTER angegebene Modell (1962; FLEISCHMAN, PORTER und PRESS, 1963) wegen seiner Anschaulichkeit und Einfachheit besonderen Anklang fand (siehe Abbildung 15). Demnach besteht das Molekül des γ S-Globulins, und zwar des normalen wie des immunen, aus 4 Polypeptidketten, die über Disulfid- und Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Die beiden schwereren H-Ketten (= heavy), auch A-Ketten genannt, besitzen ein Molekulargewicht von ca. 50.000 (EDELMAN und GALLY, 1962; FLEISCHMAN, PAIN und PORTER, 1962) und bestimmen die Eigenart

eines γ -Globulins als IgG-, IgM- oder IgA-Globulin. Die H-Ketten werden demzufolge auch als γ -, μ - bzw. α -Ketten bezeichnet. (Wegen der unterschiedlichen Bezeichnungen, die in diesem Zusammenhang verschiedene Autoren für an sich identische Begriffe benutzten, ist von der WHO eine einheitliche Nomenklatur vorgeschlagen worden (Bull. World Health Org., 1964). In vorliegender Arbeit sind diese Empfehlungen berücksichtigt worden.)

Die antigene Verwandtschaft dieser drei Immunglobuline beruht hingegen lediglich auf ihrem gemeinsamen Gehalt an leichteren L-Ketten (= light) bzw. B-Ketten mit einem Molekulargewicht von ca. 20.000. Diese L-Ketten kommen in zwei antigen unterschiedlichen Modifikationen als sog. λ - oder κ -Ketten vor. Die bivalente Natur des IgG-Globulin-Moleküls findet ihren Ausdruck in dem symmetrischen Bau des PORTERschen Strukturmodells. Diese Vorstellungen sollen gleichermaßen für das IgG-Globulin vom Mensch und Kaninchen zutreffen.

Um zu diesen im PORTERschen Schema in knappster Form zusammengefaßten Erkenntnissen zu gelangen, sind im wesentlichen folgende methodischen Wege beschritten worden: Das IgG-Globulin wurde mittels Fermenten (Papain, Pepsin), Reduktionsmitteln (Mercaptoäthanol, Cystein) und Wasserstoffbrücken lösenden Agenzien (Harnstoff, Propionsäure) in Fragmente bzw. Peptidketten aufgespalten, die anschließend durch Ionenaustauschchromatographie, Elektrophorese oder Gelfiltration isoliert wurden. So hatte PORTER (1959) präzipitierendes IgG-Globulin vom Kaninchen in Gegenwart von Cystein mit kristallinem Papain behandelt. Nach Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose wurden drei Fraktionen erhalten, die von ihm in der Reihenfolge der Elution mit I, II und III bezeichnet wurden. Mit der gleichen Methode sind von EDELMAN, HEREMANS, HEREMANS und KUNKEL (1960) entsprechende Fragmente aus menschlichem IgG-Globulin dargestellt worden, die nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit die Bezeichnungen S (= slow), als einem Gemisch von zwei weitgehend identischen Bruchstücken, und F (= fast) erhielten. Es entsprechen sich die Bruchstücke S

und I bzw. II sowie die Bruchstücke F und III. Die Fragmente S und I bzw. II hatten ein Molekulargewicht von ca. 45.000; sie enthielten Anteile einer γ -Kette sowie eine λ - oder κ -Kette und können die Eigenschaften univalenter bzw. blockierender Antikörper besitzen. Nach den erwähnten Empfehlungen werden diese Fragmente heute einheitlich als F(ab) (ab = antigen binding) bezeichnet. Die Fragmente III bzw. F besitzen ein Molekulargewicht von etwa 55.000, bestehen nur aus den übrigen Anteilen der beiden γ -Ketten und besitzen keinerlei Antikörperaktivität. Da sie kristallisierbar sind, erhielten sie den Namen Fc (c = cristallisable). Demgegenüber ließ sich durch Pepsinandauung von IgG-Globulin neben niedermolekularen Peptiden ein Fragment mit dem Molekulargewicht von 105.000 darstellen, das komplette Antikörperwirkung zeigte (NISONOFF, WISSLER und WOERNLEY, 1959). Dieses Hauptfragment entspricht weitgehend der Summe der beiden F(ab)-Bruchstücke und wird daher F(ab')₂ genannt.

Bei Verwendung von Substanzen, welche Disulfid- bzw. Wasserstoffbrücken zu sprengen vermögen, werden lediglich die erwähnten H- und L-Ketten freigemacht; sie sind weitgehend unlöslich. (Es wurden u.a. verwendet: Harnstoff und Mercaptoäthanol von EDELMAN (1959), EDELMANN und POULIK (1961); nur Mercaptoäthanol von FLEISCHMAN, PAIN und PORTER (1962); Mercaptoäthanol und Propionsäure von PALMER und NISONOFF (1964).)

Da es wegen dieser neuen Erkenntnis notwendig war, entsprechende Untersuchungen auch über die Spaltwirkung des Diphthins durchzuführen und die Fragmente näher zu untersuchen, sind von SCHIFF und WEISE (noch unveröffentlicht) diesbezügliche Versuche durchgeführt worden. Hierbei ergab sich folgendes: Im pH-Bereich von 5 - 9 vermag Diphthin ohne Aktivierung durch Cystein und sogar bei Zusatz von Cysteinhemmern das IgG-Globulin vom Mensch und Kaninchen in zwei Fragmente aufzuspalten. Die mittels Gelfiltration (Sephadex G-100) isoliert gewonnenen Bruchstücke I und II (in der Reihenfolge ihrer Eluierung) hatten Molekulargewichte von 90.000 - 95.000 ($S_{20} = 5,75$ beim Mensch und 5,03 beim Kaninchen) bzw. 40.000 - 45.000 ($S_{20} = 3,25$ beim Mensch und 3,8 beim Kaninchen), und zwar weitgehend

übereinstimmend bei Mensch und Kaninchen. Während beim Human-IgG-Globulin das größere Fragment eine langsamere und das kleinere Fragment eine schnellere elektrophoretische Beweglichkeit als das native Globulin besaß, zeigten beim IgG-Globulin vom Kaninchen die beiden Fragmente unter sich ein umgekehrtes Wanderungsverhalten. Die ausschließlich an das größere Diphthinfragment I gebundene komplette Antikörperaktivität konnte nur für Agglutinine und Präzipitine, dagegen nicht für Hämolyse bzw. sonstige komplementbindende Antikörper nachgewiesen werden. Offensichtlich liegt der Wirkung des Diphthins ein enzymatischer Vorgang zugrunde. Hierfür sprach eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Effekt von Papain und Pepsin und nicht zuletzt die antigene Übereinstimmung der beiden Diphthinbruchstücke mit den vergleichbaren Papain- bzw. Pepsinfragmenten: Aus diesen Gründen haben SCHIFF und WEISE in Anlehnung an die gebräuchliche Nomenklatur die Diphthinfragmente I und II mit $d^1_F(ab)_2$ und d^1_{Fc} bezeichnet.

Um diesen Fragenkomplex abzuklären, war für vorliegende Arbeit die Aufgabe gestellt, die nach Diphthinbehandlung von IgG-Globulin vom Mensch und Kaninchen resultierenden Fragmente weiter auf ihre chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften zu untersuchen und den Spalteffekt des Diphthins im Hinblick auf dessen Hämolyseeschutzwirkung zu prüfen.

II. Materialien und Methodik

=====

1. Gewinnung und Reinigung von Diphthin:

Die Reinigung von Diphthin erfolgte nach dem von SCHIFF (1964d) mitgeteilten Verfahren aus Kulturfiltraten (Pope-Bouillon, 10-täg. Bebrütung bei 33°C) des atoxigenen Diphtheriebakterienstammes 29619. Im wesentlichen handelt es sich hierbei um eine Ausfällung diphthinreichen Materials aus Kulturfiltraten mit Methanol und Äther, Entfernung weiterer Ballaststoffe durch Aufnahme des Präzipitats in HCl, Lösung des in HCl unlöslichen Rückstandes in Wasser, Behandlung dieser Lösung mit einer homogenen Phenol-Wassermischung in Wärme (68°C) nach der Methode von WESTPHAL und Mitarbeitern (1952), Ausfällung des Diphthins aus der Phenolphase mittels Methanol und anschließende Gefriertrocknung. Die Diphthin-Trockensubstanz wurde bei + 5°C verschlossen aufbewahrt. Für jeden Versuch wurden Diphthinlösungen frisch angesetzt.

2. Immunisierung von Menschen und Kaninchen zur Gewinnung von Immunsereen:

Zur Gewinnung von Anti-A-Immunsereen erhielten Probanden der Blutgruppe 0 im Abstand von 3 - 4 Tagen subc. Injektionen steigender Mengen von 1; 1,5; 2 und 3 ml menschlichen A-Speichels. Präzipitierende Anti-Humanglobulin-Seren stammten von Kaninchen, die im Abstand von 3 - 4 Tagen 6 - 8 i.v. Injektionen von jeweils 2,0 ml Menschenserum oder 2,0 ml 2,5%iger - Globulinlösung erhielten.

Zur Herstellung von hämagglutinierenden (hämolyisierenden) Anti-Schafblut-Immunsereen wurden Kaninchen mit 5 - 10 ml einer 10%igen Suspension von Schaf-Erythrocyten immunisiert.

Die Blutentnahmen erfolgten jeweils etwa 14 Tage nach der letzten Injektion.

3. Gewinnung und Reinigung von IgG-Globulin:

Nach Dialyse von normalen oder immunen Menschen- und Kaninchenserum gegen 0,01 molaren Na-Phosphatpuffer (pH 7,6) wurde das IgG-Globulin durch Säulenchromatographie (Säule 60 x 4 cm) auf DEAE-Cellulose (Fa. Serva, Heidelberg) nach der Methode von SOBER und PETERSON (1958) abgetrennt. Nach 24-std. Dialyse des Eluats gegen Aqua dest. wurde das IgG-Globulin gefriergetrocknet und bei - 15°C aufbewahrt. Seine Reinheit wurde durch Stickstoffbestimmungen nach KJELDAHL und mittels Immunelektrophorese geprüft. Falls bei einem Globulinpräparat der N-Gehalt unter 16 % lag, erfolgte bei den Versuchen eine Korrektur durch entsprechend höhere Einwaagen.

4. Behandlung von IgG-Globulin mit Diphthin und Trennung der Diphthinfragmente:

Im allgemeinen wurde eine 1,5%ige Lösung von IgG-Globulin (vom Mensch oder Kaninchen) mit einer 0,015%igen Diphthinlösung im Verhältnis 9 : 1 gemischt und 16 Stdn. bei 37°C inkubiert; als Lösungsmittel diente meistens ein 0,01 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,6).

Die Auftrennung der Diphthinfragmente erfolgte durch Gel-filtration mit Sephadex unter Verwendung des gleichen Puffers. Das Eluat wurde im Fraktionssammler aufgefangen und die einzelnen Fraktionen durch photometrische Messung bei 253 m μ mittels eines Schreibers lokalisiert. Die Fraktionen wurden anschließend im Hochvakuum über Phosphorpentoxid (Sicapent der Fa. Schuchardt, München) gefriergetrocknet.

5. Serologischer Maustest:

Quantitative Untersuchungen der Hämolyse-schutzwirkung des Diphthins wurden mittels des von SCHIFF (1961c) angegebenen serologischen Maustests vorgenommen. Dazu erfolgte bei Mäusen (pro 25 g) eine i.v. Injektion von 6 Stdn. bei 22°C inkubierten Mischungen von jeweils 0,1 ml eines Anti-Schaf-Hämagglutinins vom Kaninchen (Titer 1 : 8.000) und 0,1 ml fallender Verdünnungen einer Diphthinlösung (1 mg/ml) bzw. zur Kontrolle NaCl-Lösung. 20 Stdn. später wurden die Mäuse

entblutet und die einzelnen Seren auf ihren Gehalt an Anti-Schaf-Hämagglutinin geprüft.

6. Agar- und Immunelektrophorese:

Für die Agar- und Immunelektrophorese wurde die Ausrüstung der Firma LKB (Stockholm) verwendet. Als Laufpuffer diente eine Lösung von 0,05 M Na-Diäthylbarbiturat, 0,01 M Diäthylbarbitursäure und 0,05 M Na-Acetat (pH 8,6; $\mu = 0,1$). Zur Herstellung des Agargels wurden 1,25 % "Difco" Special Agar Noble in obigem, mit Aqua dest. auf die Hälfte verdünnten Puffer verwendet. Die Elektrophoresedauer betrug 80 min. bei einer Spannung von 10 - 12 V/cm. Für die Präzipitation wurden selbst hergestellte Antiseren vom Kaninchen und im Handel befindliche Seren verwendet. Die Färbung erfolgte in einer gesättigten Lösung von Amidoschwarz 10B in 90 % Methanol und 10 % Eisessig.

7. Aminosäureanalyse:

50 mg lyophilisiertes IgG-Globulin bzw. dessen Fragmente wurden in 6 N HCL bei 120°C am Rückfluskkühler hydrolysiert, das Hydrolysat im Rotationsverdampfer bei 60°C bis zur Trockene eingengt und in 10 ml 0,1 N HCL wiederaufgenommen. Zur Analyse wurden 0,5 ml dieser Lösung (entspricht 2,5 mg Protein) verwendet. Die Aminosäurechromatographie erfolgte nach der von MOORE und STEIN (1951) und MOORE, SPACKMAN und STEIN (1958) beschriebenen Methode mit einer Apparatur der Fa. Bender & Hoben, München. Zur Säulenfüllung benutzten wir Amberlite CG 120/II, Partikelgröße 0,03 - 0,04 μ (Fa. Serva, Heidelberg), wobei zur Auftrennung der Monoaminocarbonsäuren und Monoamino-dicarbonsäuren eine Gradientenelution mit Citratpuffer (pH 3,1 - 5,1) bei konstanter Natriumkonzentration von 0,2 N angewandt und zur Trennung der Diaminomonocarbonsäuren am gleichen Austauscher als Elutionsmittel Citratpuffer von pH 4,26 mit einer Natriumkonzentration von 0,34 N verwendet wurde. Die Aufzeichnung geschah mittels eines Multichannel Absorptiometer der Fa. LKB, Stockholm, und eines Schreibers der Fa. Honeywell, London. Zum Erhalt von Bezugswerten ist eine Lösung von äquimolaren Mengen (jeweils 1 Mikromol/1,0 ml) von 20 zu erwartenden Amino-

säuren (der Firmen E. Merck, Darmstadt, und Th. Schuchardt, München) chromatographiert worden.

8. Kohlehydratbestimmungen:

Proteingebundenes Kohlehydrat wurde mittels der 3 folgenden Methoden bestimmt.

a) Bestimmung durch Pikrinsäure: Bei dieser Methode wird die gelbe Pikrinsäure durch Zucker und andere reduzierende Substanzen im alkalischen Milieu zur roten Pikraminsäure reduziert. 25 mg Protein werden in 5 ml 2 N HCl 2 Stdn. bei 100°C hydrolysiert. Eine Mischung von 2,0 ml Hydrolysat, 1,0 ml 1%ige Pikrinsäure und 1,0 ml 28%ige NaOH läßt man genau 5 min. bei 100°C miteinander reagieren. Danach wird die Mischung in Eiswasser abgekühlt und der Extinktionswert mittels Photometer "Eppendorf" bei 570 m μ gemessen. Als Leerwert dient eine Mischung von 2,0 ml 2 N HCl, 1,0 ml 1%ige Pikrinsäure und 1,0 ml 28%ige NaOH. Zur Erstellung der Eichkurve werden äquimolare Lösungen von Glucose und Mannose in 2 N HCl verwendet.

b) Bestimmung durch Anthron-Reagenz: Das Prinzip der Methode beruht auf der Bildung eines Farbkomplexes zwischen Anthron-Reagenz und dem durch konzentrierte Schwefelsäure gebildetem Furfural-Derivat der Hexosen. Bei der Bestimmung von proteingebundenen Hexosen ist zu beachten, daß das Tryptophan des Proteins ebenfalls mit dem Furfural reagiert, wobei keine grüne sondern eine weinrote Farbe entsteht. Für die Aufstellung der Eichkurve muß daher Tryptophanlösung (0,1%ig in 75%iger H₂SO₄) mitverwendet werden. 1,0 ml einer 0,3%igen wässerigen Proteinlösung wird mit 1,0 ml obiger Tryptophanlösung und 4,0 ml Anthron-Reagenz (0,2%ig in 75 % H₂SO₄) 15 min. im kochenden Wasserbad erhitzt. Danach wird die Mischung auf 0°C abgekühlt und nach weiteren 10 min. bei 620 m μ photometriert. Der Leerwert wird mit 1,0 ml Aqua dest. angesetzt. (RADIN, LAVIN und BROWN, 1955; HOLT, 1954; HÄNDEL und KITLAK, 1963.)

c) Nachweis mittels SCHIFF'schem Reagenz: Diese Methode wurde zum Nachweis von proteingebundenem Kohlehydrat bei der Agarelektrophorese benutzt. Durch 1%ige Perjodsäure werden benachbarte Hydroxylgruppen des Zuckers zur Dialdehydgruppe

oxydiert; diese Dialdehydgruppe reagiert sodann im sauren Milieu bei Anwesenheit von SO_2 mit dem durch die Einwirkung von H_2SO_4 auf Fuchsin entstandenem SCHIFF'schem Reagenz zu einer roten Komplexverbindung (Labormethode nach URIEL, 1960).

9. Bestimmung von freier N-Acylneuraminsäure:

0,2 ml Serum, das durch Säurehydrolyse (0,1 N H_2SO_4 , 1 Std. bei 80°C) oder durch Neuraminidase zwecks Freisetzung der N-Acylneuraminsäure behandelt worden ist, wird mit 0,1 ml 0,2 M Na-meta-Perjodat in 9 M Phosphorsäure oxydiert (wahrscheinlich zu β -formal-Brenztraubensäure). Hierauf erfolgt ein Zusatz von 1,0 ml einer Lösung von 10%iger Na-Arsenit in 0,5 M Na-Sulfat und 0,1 N Schwefelsäure. Nach einer vorübergehenden Gelbbraun-Färbung werden 3,0 ml einer 0,6%igen Thio-barbitursäure in 0,5 M Na-Sulfatlösung hinzugegeben. Nach 15 min. Kochen im Wasserbad und 5 min. Abkühlen mit Leitungswasser wird mit 4,3 ml Cyclohexanon geschüttelt und nach Zentrifugieren der rotgefärbte Cyclohexanon-Überstand bei 549 m μ photometriert. (In einer Analysenprobe sollen 0,01 - 0,05 μMol Neuraminsäure enthalten sein, da in diesem Bereich die Farbentwicklung linear zur Neuraminsäurekonzentration verläuft.) (WARREN, 1959) Die Eichkurve wurde erstellt mit wasserfreier Neuraminsäure der Fa. General Biochemicals, Chagrin Falls, Ohio.

III. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

A. Spaltung von IgG-Globulin und Isolierung der Spaltstücke

Mittels der Gelfiltration mit Sephadex (o.ä.) nach PORATH und FLODIN (1959) ist die Möglichkeit gegeben, aus einem Substanzgemisch die einzelnen Komponenten unabhängig von ihrer elektrischen Ladung nach dem Molekulargewicht und der Molekülgestalt zu trennen. Diesem Trennvorgang liegt ein Siebeffekt zugrunde, der je nach Geltyp und Perlgröße variieren kann: Moleküle, die größer als die Poren im Sephadex-Gel sind, die also oberhalb seiner Ausschlußgrenze liegen, dringen nicht in die Gelperlen ein und wandern daher auf dem kürzeren bzw. schnelleren Weg außerhalb der Partikel durch die Säulenfüllung und werden folglich zuerst eluiert. Kleinere Moleküle dagegen dringen in einem von ihrer Größe und Form abhängigen Maß in die Gelpartikel ein; sie wandern daher unterschiedlich verzögert durch die Sephadexfüllung und werden in Reihenfolge abnehmender Molekülgröße eluiert. (Ob eine bestimmte Substanz oberhalb oder innerhalb des Fraktionierungsbereichs, d.h. im Ausschluß oder im Einschluß, die Säule verläßt, ist im allgemeinen daran erkennbar, daß im ersten Fall ein sehr steiler Kurvenanstieg unmittelbar nach Durchfluß des Volumens der vorauslaufenden äußeren Säulenfüllung auftritt und im zweiten Fall das Eluat bei weniger steilem Kurvenanstieg nach einem Volumen erscheint, das in der Regel dem (größeren) Volumen der gesamten Säulenfüllung gleichkommt. Aus den Bezeichnungen für die verschiedenen Geltypen geht die ungefähre Ausschlußgrenze hervor. Z.B. liegt diese für Sephadex G-100 bei einem Molekulargewicht von etwa 100.000 und für Sephadex G-75 bei etwa 75.000.) Ferner gestattet das Elutionschromatogramm, falls es sich um Substanzen mit ähnlichem Absorptionsspektrum handelt, durch Vergleich der Flächeninhalte der einzelnen Kurven gewisse Rückschlüsse auf die Mengenverhältnisse, in denen die einzelnen Substanzen eluiert worden sind.

Wie SCHIFF und WEISE gezeigt haben, können die nach Diphth-inbehandlung von IgG-Globulin vom Mensch und Kaninchen anfallenden beiden Globulinfragmente durch Gelfiltration auf Sephadex G-100 oder G-75 getrennt werden. Bei unseren Versuchen haben wir dasselbe Verfahren angewandt.

Es wurden jeweils 500 mg IgG-Globulin in 1,5%iger Lösung in Natriumphosphatpuffer (pH 7,60; 0,01 M) mit 5 mg Diphthin für 16 Stdn. bei 37°C inkubiert. Nachdem der Erfolg der Spaltung durch Agarelektrophorese kontrolliert worden war, wurden die Globulinfragmente aus dem Inkubat (3 Läufe zu je 10 ml Inkubat mit einer Einwaage von 160 mg IgG-Globulin) durch Gelfiltration auf Sephadex G-100 oder G-75 (Säule 50 x 3,5 cm) isoliert. Hierbei ist obiger Inkubationspuffer auch zur Filtration verwendet worden.

In der Abbildung 1 sind zwei Elutionschromatogramme von diphthinbehandeltem IgG-Globulin vom Mensch bei Verwendung a) von Sephadex G-100, b) von Sephadex G-75 wiedergegeben. In beiden Fällen traten 3 Peaks auf. Die beiden ersten stellen die IgG-Globulinfragmente $^{di}F(ab)_2$ und ^{di}Fc dar. Beim dritten, kleinsten Gipfel handelt es sich um (papierchromatographisch nachgewiesene) niedermolekulare Substanzen, v.a. Aminosäuren, Peptide und Zucker. (Nach einer Dialyse des Inkubats fehlt dieser Nachgipfel.) Aufgrund des Flächenverhältnisses der beiden ersten Kurven von ca. 2 : 1 kann ein ungefähr gleiches Mengenverhältnis für die beiden isolierten Diphthinfragmente angenommen werden. Die beiden Chromatogramme unterscheiden sich im wesentlichen nur dadurch, daß $^{di}F(ab)_2$ bei a) innerhalb des Fraktionierungsbereichs, bei b) hingegen im Ausschluß liegt. Im letzteren Fall entspricht der Kurvenverlauf dem in der Abbildung 1a ebenfalls im Ausschluß erscheinenden unbehandelten IgG-Globulin (aufprojizierte, gestrichelte Linie). Aus dem Elutionsverhalten der beiden Fragmente kann man auf ein Molekulargewicht zwischen 75.000 und 100.000 für $^{di}F(ab)_2$ und unter 75.000 für ^{di}Fc schließen.

Auf dem gleichen Weg erhielten wir prinzipiell übereinstimmende Befunde bei Verwendung von diphthinbehandeltem IgG-Globulin von normalen und immunen (Anti-Schafblut) Kaninchen-seren.

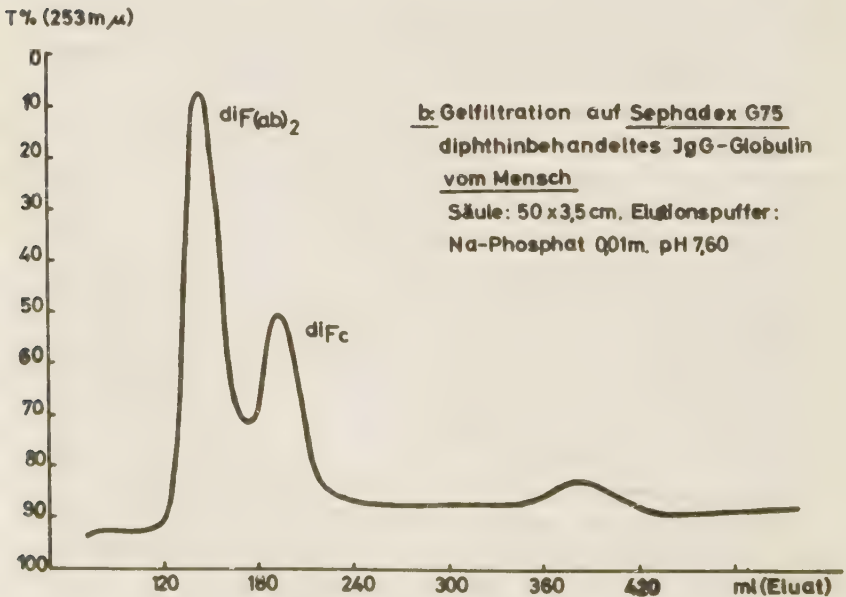
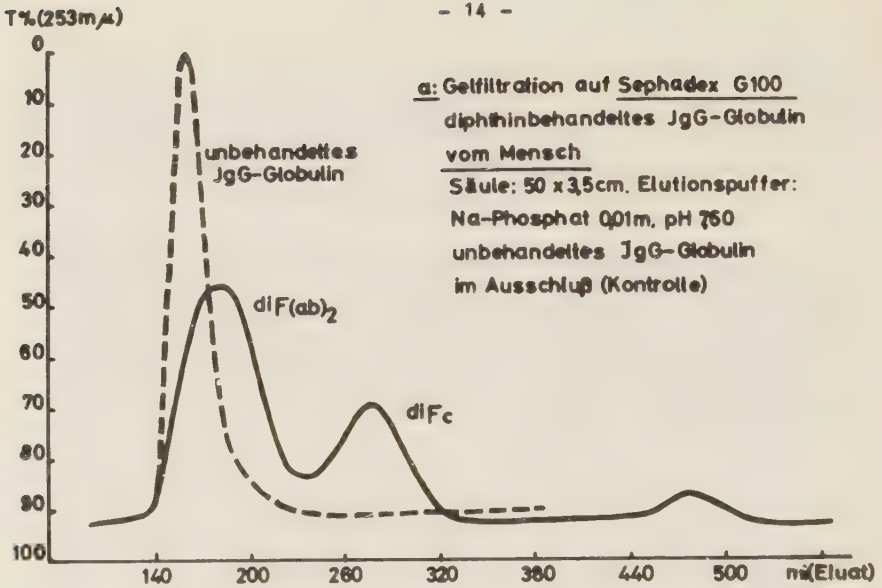


Abbildung:1

Das immuno- und agarelektrophoretische Verhalten der aus IgG-Globulin vom Mensch und Kaninchen isolierten Diphthinfragmente geht aus der Abbildung 2 hervor (vgl. hierzu S. 6).

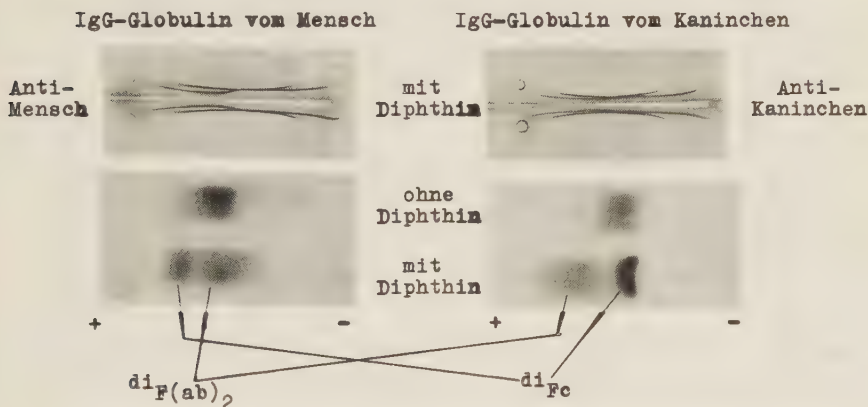


Abbildung 2: Immuno- und Agarelektrophorese von normalem und diphthinbehandeltem IgG-Globulin vom Mensch und Kaninchen

B. Reaktionskinetik der IgG-Globulinspaltung mit Diphthin

Nach Feststellungen von SCHIFF und WEISE erfolgt bei hohen Diphthinkonzentrationen die Spaltung des IgG-Globulins fast augenblicklich, während bei kleineren Diphthinmengen trotz längerer Inkubationszeit ein Teil des IgG-Globulins noch ungespalten bleibt. Zur Untersuchung einer Zeitabhängigkeit des Spalteffektes wurde 1 g IgG-Globulin (vom Kaninchen) mit 10 mg Diphthin in 100 ml Na-Phosphatpuffer (pH 7,6; 0,01 M) bei 37°C inkubiert. Nach 3, 15, 30, 45 min. sowie 1, 6 und 16 Std. Inkubation wurden dem Inkubat Proben entnommen, die bis zur Gelfiltration eingefroren blieben. Um bei diesem Verfahren eine Trennung von ungespaltenem IgG-Globulin vom Fragment $di_F(ab)_2$ zu erreichen, wurde eine Säule (60 x 3,5 cm) verwendet, deren unteres Drittel mit Sephadex G-150 und darüber mit Sephadex G-100 gefüllt worden war. Aus der Abbildung 3 ist die zeitliche Entwicklung der Spaltung zu entnehmen. Demnach war

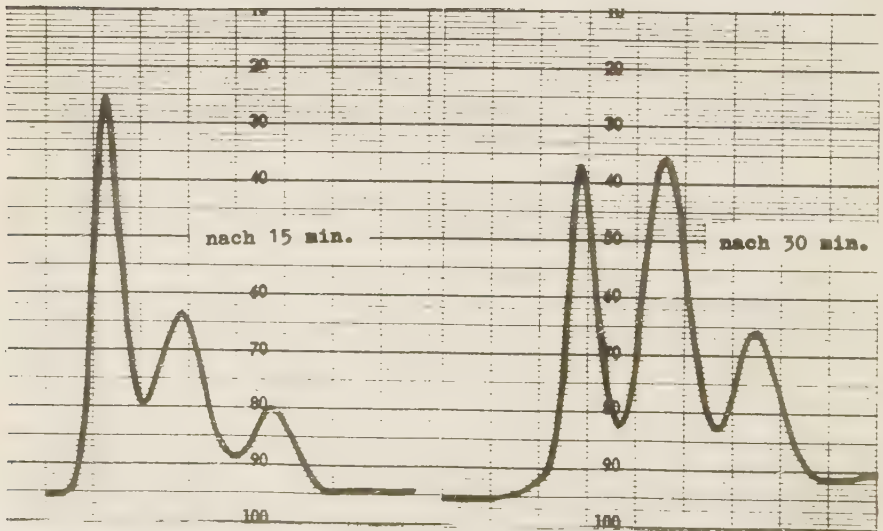
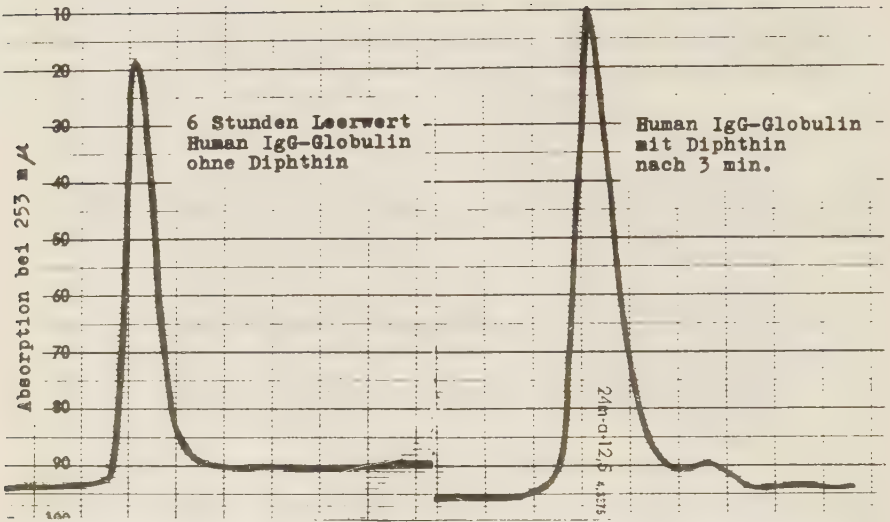


Abbildung 3: Gelfiltration nach verschieden langer Inkubationszeit von IgG-Globulin (Mensch) und Diphthin

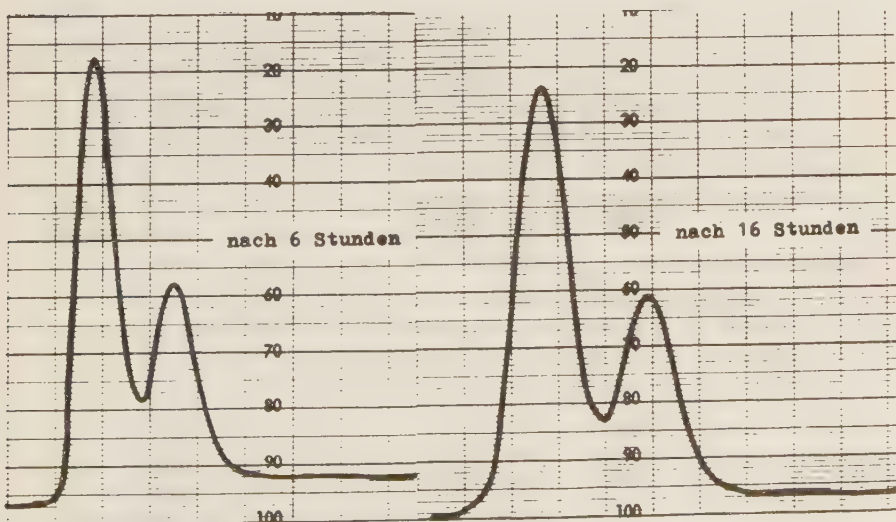
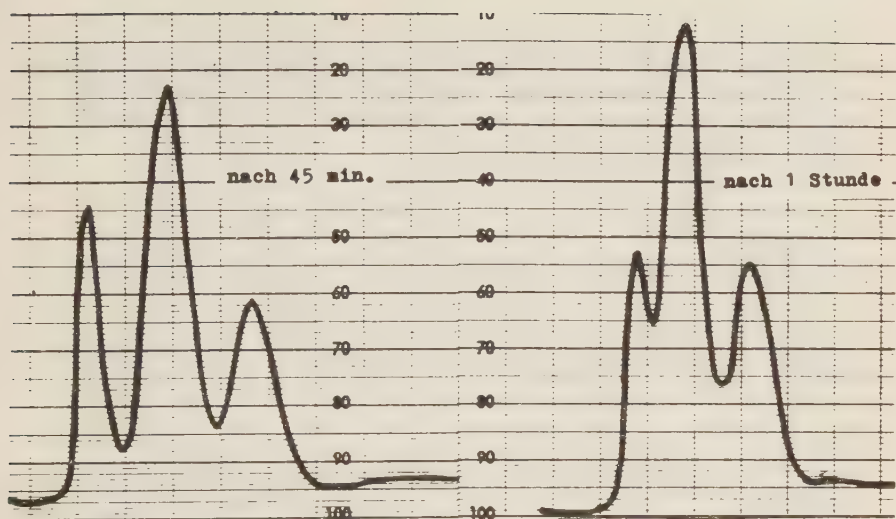


Abbildung 3 Fortsetzung: Gelfiltration nach verschieden langer Inkubationszeit von IgG-Globulin (Mensch) und Diphthin

bei den gewählten Mengenverhältnissen der Spalteffekt bereits nach 3 min. Inkubierung nachweisbar und vor Ablauf von 6 Stunden weitgehend abgeschlossen. (Hierzu sei bemerkt, daß bei den angegebenen Zeiten die zu Beginn der Säulenläufe weitergehende Inkubierung unberücksichtigt blieb.)

C. Aminosäurenanalyse von nativem IgG-Globulin und dessen
Fragmenten $^{di}F(ab)_2$ und ^{di}Fc

Bei dem auf Seite 9 beschriebenen Trennverfahren arbeitet man mit einer optimalen Säulentemperatur von 50°C. Da hierbei Valin und Cystin nicht getrennt werden, sind diese beiden Aminosäuren als Summe erfaßt und angegeben worden. Auf eine Bestimmung des nur bei alkalischer Hydrolyse stabilen Tryptophans ist verzichtet worden.

Das für diese Versuche verwendete IgG-Globulin stammte von einem einzelnen Menschenserum bzw. von gepooltem Kaninchenserum. Als Beispiel für die mittels des Aminosäuren-Analysators erhaltenen Befunde seien in der Abbildung 4 lediglich die Chromatogramme wiedergegeben, die nach Säurehydrolyse von Kaninchen-IgG-Globulin und dessen Diphthinfragmenten $^{di}F(ab)_2$ und ^{di}Fc resultierten. Die durch Planimetrierung der Kurven ermittelten Werte sind in der Tabelle 1 angeführt und der von CRUMPTON und WILKINSON (1963) auf dem gleichen Wege ermittelten Aminosäurezusammensetzung von IgG-Globulin vom Mensch und Kaninchen gegenübergestellt. Vergleichsweise ist die aus den Angaben dieser Autoren von uns errechnete Aminosäurezusammensetzung der beiden Papainfragmente Fab und Fc beim Kaninchen mitangegeben. (In der betr. Arbeit wurde der Aminosäuregehalt der H- und L-Ketten des intakten IgG-Globulins sowie für dessen Papainfragmente mitgeteilt. Um die Vergleichsergebnisse zu erhalten, wurden für Fab die Werte der L-Ketten und der H-Kettenanteile von Fab jeweils summiert und für Fc entsprechend dessen Gewichtsanteil an den kompletten H-Ketten, jeweils 60 % der publizierten Zahlenangaben genommen.) Im allgemeinen stimmen die von CRUMPTON und WILKINSON und von uns für die IgG-Globuline mitgeteilten

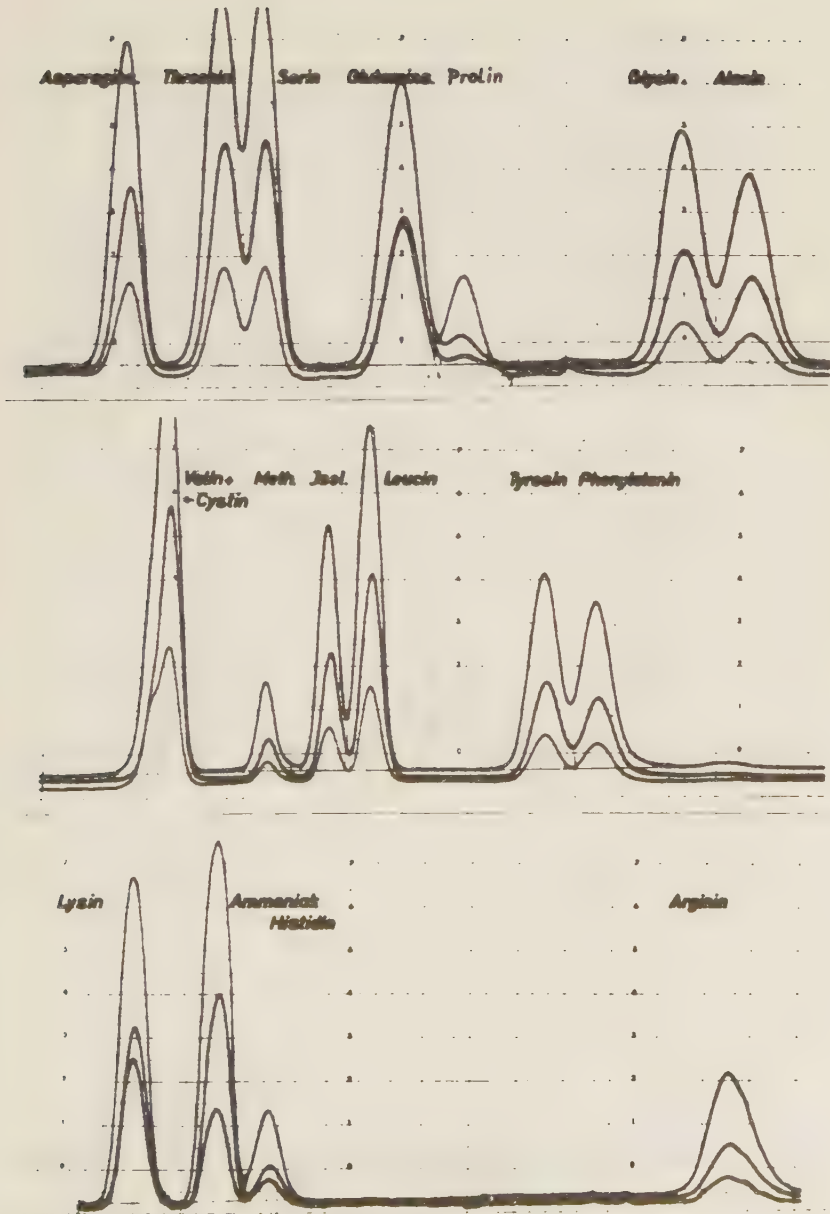


Abb. 4a: Aminosäurechromatographie von IgG-Globulin (Kaninchen).

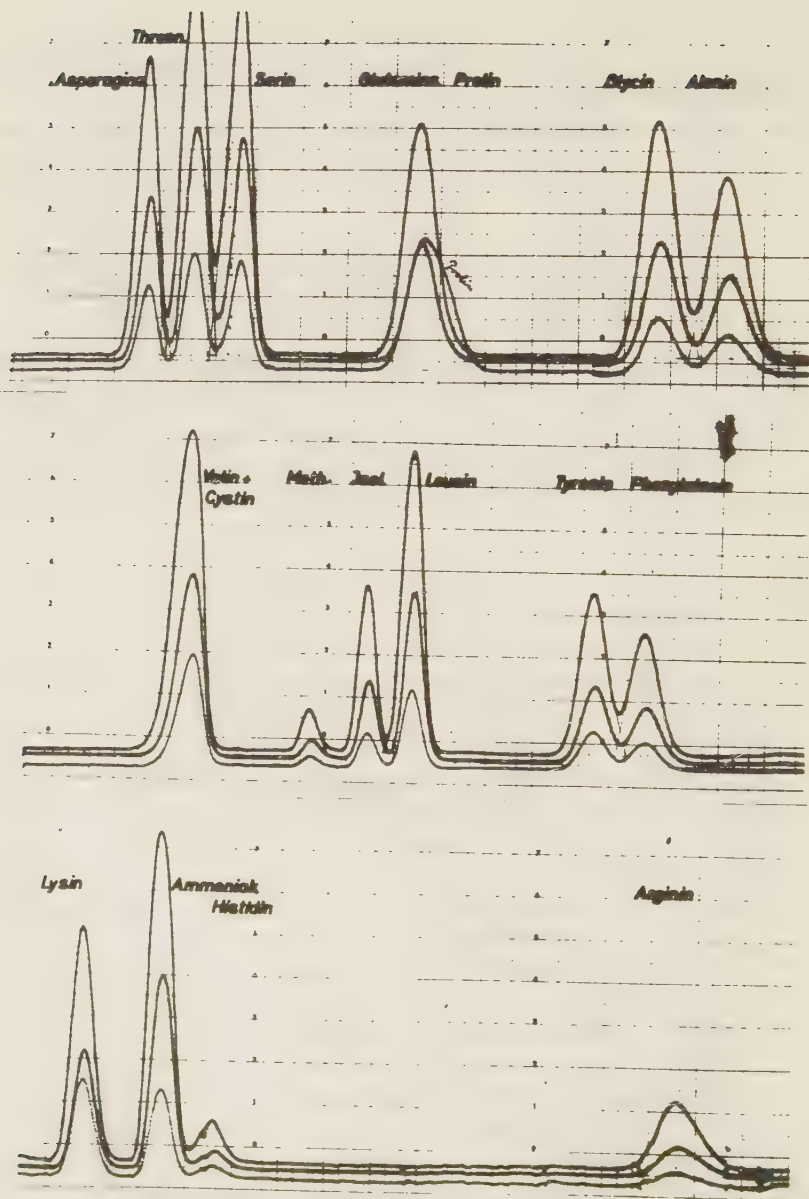


Abb.4b: Aminosäurechromatographie von Fragment d F(ab)₂ (Kaninchen)

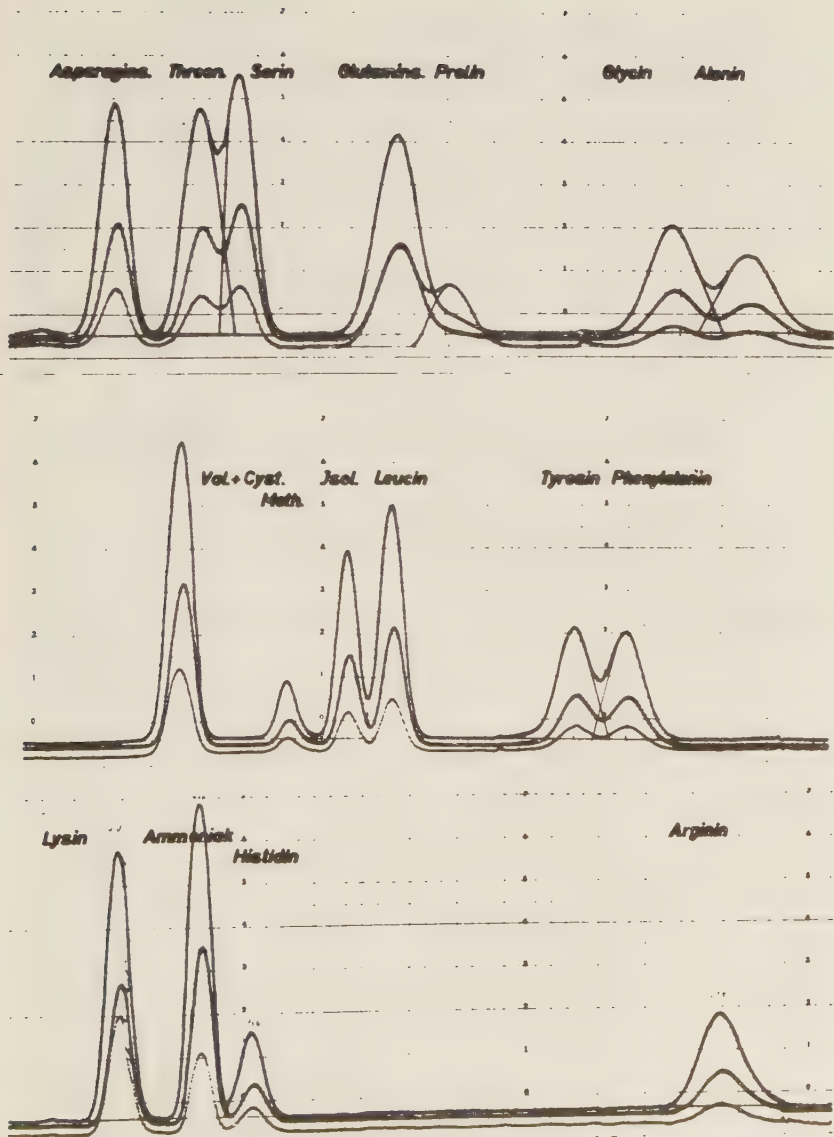


Abb 4c: Aminosäurechromatographie von Fragment di Fc (Kaninchen).

	beim Mensch			beim Kaninchen				
	IgG-Globulin (*)	di _{F(ab)} 2	di _{Fc}	IgG-Globulin (*)	di _{F(ab)} 2	Papain- Fr. *) Fab	di _{Fc}	Papain- Fr. *) Fc
1. Lysin	3,5	3,0	3,6	3,0	2,3	2,3	2,6	3,2
2. Histidin	1,2	1,0	1,2	0,9	0,7	0,5	0,9	1,0
3. Arginin	1,9	1,5	1,6	2,2	1,2	1,5	1,9	2,7
4. Asparagins.	4,0	3,9	4,0	2,5	3,6	3,8	3,6	4,1
5. Threonin	3,4	3,7	3,1	5,2	5,6	6,1	4,8	5,4
6. Serin	4,5	4,9	4,4	4,0	4,2	4,5	5,0	4,7
7. Glutamins.	6,1	6,1	6,2	5,6	5,5	4,7	4,8	5,7
8. Prolin	3,1	3,5	3,0	3,4	3,0	2,8	3,6	3,9
9. Glycin	1,8	2,1	1,5	2,6	2,5	2,3	2,3	2,0
10. Alanin	2,0	2,0	2,3	2,5	1,8	2,1	2,1	1,9
11. Cystin	5,0	5,1	5,0	4,4	5,5	4,4	5,2	4,4
12. Valin	4,0	0,6	0,5	4,2	0,4	0,3	0,5	0,7
13. Methionin	0,5	1,1	1,1	0,7	1,5	1,4	1,4	1,9
14. Isoleucin	1,3	3,5	3,8	2,5	2,9	3,3	3,0	3,7
15. Leucin	3,7	2,5	2,1	3,4	3,1	3,3	2,7	3,0
16. Tyrosin	2,9	1,9	2,1	3,3	2,3	1,9	2,4	2,2
17. Phenylalanin	2,1	nicht bestimmt		2,6		nicht bestimmt		
18. Tryptophan								
insgesamt	47,0	46,3	45,5	51,2	45,4		46,8	

*) Vergleichswerte für natives IgG-Globulin bzw. deren Papainfragmente nach den Angaben von CRUMPTON und WILKINSON (1963).

Tabelle 1: Aminosäurezusammensetzung (in mg pro 50 mg Protein) von IgG-Globulin (vom Mensch und Kaninchen) und dessen Diphthnframenten.

Werte gut überein; größere Differenzen bestanden beim Mensch in 2 Fällen (0,3 bis 0,5 mg Differenz) und beim Kaninchen in 6 Fällen (0,3 bis 0,8 mg Differenz). Während CRUMPTON und WILKINSON relativ große quantitative Unterschiede im Aminosäuregehalt der beiden Papainfragmente beim Kaninchen fanden, waren die entsprechenden Differenzen zwischen den beiden Diphthinf Fragmenten geringer. Eine ähnliche Aussage gilt hinsichtlich der Abweichungen zwischen den vergleichbaren Bruchstücken (s. Tabelle 1) ^{di}Fc und Fc bzw. $^{di}F(ab)_2$ und $F(ab)$. Es bliebe zu klären, welche Bedeutung diesen Unterschieden beizumessen ist.

D. Bestimmung der proteingebundenen Kohlehydrate von IgG-Globulin und dessen Diphthinf Fragmenten

Der Kohlehydratgehalt des IgG-Globulins beträgt beim Menschen 2 - 3 % (MÜLLER-EBERHARD, KUNKEL und FRANKLIN, 1956) und beim Kaninchen 3 - 4 % (FLEISCHMAN, PORTER und PRESS, 1963). Nach den zuletzt genannten Autoren sind beim Kaninchen 95 % der Kohlehydrate an die H-Ketten gebunden; nach der Spaltung des IgG-Globulins durch Papain finden sich 2/3 des Zuckergehaltes bei Fc , während das restliche Drittel als Glykopeptid freigesetzt wird. Aus diesem Grunde vermuten die Autoren, daß die Kohlehydrate an zwei verschiedenen Stellen der H-Ketten lokalisiert sein könnten. Den Feststellungen von FRANKLIN (1960) zufolge sind sogar etwa 90 % der Zucker sowohl beim Mensch wie beim Kaninchen an das Papainfragment Fc gebunden. PORTER (1959) hatte demgegenüber zwar angegeben, daß bei einem IgG-Globulin vom Kaninchen mit einem Kohlehydratgehalt von 1,1 % die Papainfragmente I, II und III zu 1,1 %, 0,25 % bzw. 2,2 % Zucker enthielten, doch berichteten später COHEN und PORTER (1964), daß die Bruchstücke I und II auch nahezu völlig zuckerfrei erhalten werden können, wobei sie auf die mit der Bestimmung von proteingebundenem Kohlehydrat verbundene Problematik hinweisen.

Wie einleitend erwähnt worden ist, hatte POULIK bei Einwirkung wenig gereinigter Chargen von Di-Toxin auf Myelomseren vom Menschen einen Verlust an proteingebundenem Kohlehydrat

festgestellt. Da diese Einbuße hauptsächlich beim γ -Globulin auftrat, wurde geprüft, ob ein derartiger Effekt auch bei Einwirkung von Diphthin auf normales γ -Globulin zu verzeichnen ist.

1. Bestimmung reduzierender Zucker mit Pikrinsäure:

Mittels dieses auf S. 9 beschriebenen Verfahrens ist der Zuckergehalt von intaktem IgG-Globulin aus einem Menschenserum und einem Kaninchen-Mischserum untersucht worden. Die nach Doppelbestimmungen erhaltenen Mittelwerte sind in der Tabelle 2 angeführt. Diesen Befunden zufolge besitzt - bezogen auf jeweils gleiche Proteinmengen - $^{di}F(ab)_2$ beim Mensch einen etwa doppelt so großen Kohlehydratgehalt wie ^{di}Fc ; beim Kaninchen verhält es sich umgekehrt. Bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Molekulargewichte ergibt sich bei einer theoretischen Komplettierung der beiden Diphthinfragmente zum IgG-Globulin ein Defizit im Zuckergehalt von etwa 0,8 %, und zwar gleichermaßen beim Mensch und Kaninchen. Ähnlich wie bei der Spaltung mit Papain erfolgt demnach auch bei einer Fragmentierung mit Diphthin eine Freisetzung von Kohlehydraten bzw. Glykopeptiden, worauf nicht zuletzt unsere chromatographischen Befunde hinweisen (s.S. 14).

	IgG-Globulin (MG 145.000)	$^{di}F(ab)_2$ (MG 95.000)	^{di}Fc (MG 45.000)	(Defizit)
Mensch	3,1 %	2,8 %	1,2 %	(0,8 %)
Kaninchen	2,4 %	1,2 %	2,5 %	(0,8 %)

Tabelle 2: Zuckergehalt (%) von IgG-Globulin (Mensch und Kaninchen) und dessen Diphthinfragmenten (Bestimmung mittels Pikrinsäure)

2. Bestimmung der Hexosen mit Anthron-Reagenz:

Bei dieser auf S. 10 beschriebenen Methode werden die colorimetrischen Befunde durch die Mitreaktion von Tryptophan beeinträchtigt. Es wurden daher die Bestimmungen an relativ geringen Mengen (3 mg) vorgenommen, obwohl dies bei der prozentualen Berechnung möglicherweise die Fehlerbreite vergrößerte. Zur Untersuchung gelangten die IgG-Globuline und deren Diphthinfragmente von 3 verschiedenen Menscheneren und einem Kaninchenserum. Die Resultate, Mittelwerte von Doppelbestimmungen, sind in der Tabelle 3 wiedergegeben.

	IgG-Globulin	$di_{F(ab)_2}$	di_{Fc}	(Defizit)
I	3,4 %	3,1 %	0,2 %	(1,3 %)
Mensch II	2,5 %	2,3 %	0,4 %	(0,8 %)
III	2,4 %	2,6 %	0,5 %	(0,5 %)
Kaninchen	2,1 %	1,2 %	2,5 %	(0,5 %)

Tabelle 3: Hexosegehalt (%) von IgG-Globulin
(Mensch und Kaninchen) und dessen
Diphthinfragmenten (Bestimmung mit
Anthon-Reagenz)

Von den Befunden für die Diphthinfragmente di_{Fc} beim Mensch abgesehen, scheinen die ermittelten Werte zu hoch zu liegen, zumal proteingebundene Kohlehydrate nur etwa zur Hälfte aus Hexosen bestehen. Desungeachtet ist es aber auffallend, daß bei di_{Fc} ein wesentlich geringerer ($\frac{1}{5} - \frac{1}{15}$) Hexosegehalt nachweisbar war als bei $di_{F(ab)_2}$. Ob diese Unterschiede methodisch bzw. präparativ bedingt waren oder aber auf einem entsprechenden Effekt des Diphthins beruhten, bedarf einer weiteren Klärung. Bemerkenswerterweise bestand beim Hexosegehalt

der Diphthinf Fragmente des Kaninchen-IgG-Globulins die gleiche Relation wie beim Gesamtkohlehydrat (vgl. Tabelle 2). Ergänzend sei angeführt, daß nach FRANKLIN (1960) das Papainfragment F(ab) beim Mensch wenig oder überhaupt keine Hexosen enthält, während nach PORTER (1959) das vergleichbare Papainfragment I vom Kaninchen einen relativ hohen Hexosegehalt besitzt.

3. Nachweis von proteingebundenem Kohlehydrat durch PAS-Färbung:

Nach Mitteilung von SCHULTZE und HEREMANS (1966) eignet sich die PAS-Färbung zwar zum Nachweis der gebundenen Kohlehydrate, doch stellt sie weitgehend einen Indikator für gebundene Neuraminsäure dar, die gewöhnlich das Ende einer Kohlehydratseitenkette am Proteinmolekül bildet.

Die Abbildung 5 zeigt die Agarelektropherogramme von diphthinbehandeltem IgG-Globulin vom Mensch und Kaninchen, wobei jeweils ein Präparat mit PAS und ein zweites zum Vergleich mit Amidoschwarz 10B gefärbt worden war. Es ergab sich, daß sowohl beim Mensch wie beim Kaninchen lediglich die schmalen (und daher konzentrierteren) Banden der di_{Fc} -Fragmente mit PAS stärker anfärbbar waren.

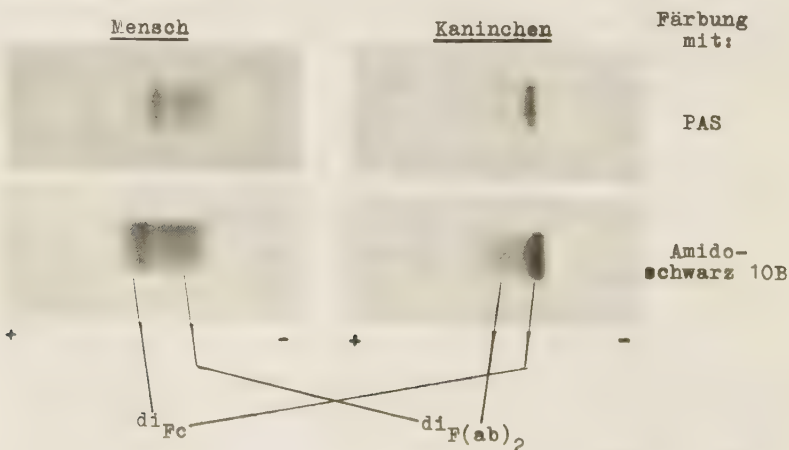


Abbildung 5: Agarelektropherogramme von diphthinbehandeltem IgG-Globulin vom Mensch und Kaninchen nach Färbung mit PAS bzw. Amidoschwarz 10B.

E. Zur Frage der Bedeutung der Neuraminidase aus Diphtherie-
bakterien-Kulturfiltraten für die Spaltung des IgG-Globulins

Wie in der Einleitung berichtet wurde, kann in Di-Rohtoxin oder in weniger hochgereinigten Di-Toxinpräparaten Neuraminidase enthalten sein. POULIK war der Ansicht, daß die nach Mischung eines Serums mit solchen Di-Toxinen in der Stärkegelelektrophorese nachweisbare Spaltung der Banden von Transferrin und γ -Globulin in jeweils 2 Quoten auf diese Neuraminidase zurückzuführen ist. Agarimmunoelktrophoretisch ist demgegenüber als Folge der Abspaltung von Neuraminsäure nur eine Verlangsamung der Beweglichkeit neuraminsäurehaltiger Proteine festzustellen (HEIDE und HAUPT, 1962). Dieselbe Beobachtung ist bereits von SCHULTZE (1960) bei Verwendung von RDE (rezeptor destroying enzyme), d.h. der von *Vibrio comma* produzierten Neuraminidase gemacht worden. (Bakterielle Neuraminidasen bilden außerdem *Cl. perfringens* (POPENOE und DREW, 1957), *Cl. septicum* und *Cl. sordelli* (WARREN und SPEARING, 1963). WARREN und SPEARING (1963) war es nicht möglich, durch Gelfiltration von bis 5-mal umkristallisiertem Di-Toxin ein neuraminidasefreies Präparat zu bekommen. Andererseits hatte SCHIFF (1964e) in einem hochgereinigten Di-Toxinpräparat von POPE Diphthinaktivität und im atoxischen Diphthin wiederum (SCHIFF, 1965) Neuraminidase nachgewiesen. Da durch 5 min. Erhitzen einer Diphthinlösung dessen Hämolyseeschutzwirkung kaum beeinträchtigt, der Neuraminidaseeffekt aber weitgehend aufgehoben wird, dürften beide Wirksamkeiten substantiell verschieden bedingt sein.

Die zur weiteren Abklärung dieser Frage vorgenommenen Versuche (Methodik s.S. 9) erbrachten folgende Resultate. RDE von *Vibrio comma* und Kulturfiltraten von *Cl. perfringens*, *Cl. novyi*, *Cl. histolyticum* und *Cl. septicum* waren trotz 1 std. Inkubierung mit Anti-Schafblut-Hämagglutinin bei 37°C im serologischen Maustest wirkungslos, d.h. sie verursachten keine intravitale Titerreduktion

RDE vermochte selbst nach mehrstündiger Inkubierung kein IgG-Humanglobulin zu spalten; immunoelktrophoretisch äußerte sich unter seinem Einfluß lediglich eine Verkürzung am "schnellen Ende" der Präzipitationslinie (s. Abbildung 6).

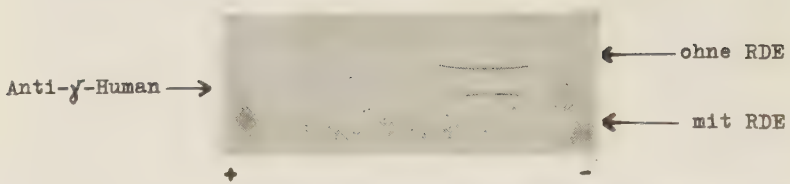


Abbildung 6: Immunelektrophorese von normalem
und mit Neuraminidase behandeltem
IgG-Globulin vom Mensch

Erhitzte (100°C) Diphthinlösung bewirkt denselben Spalteffekt auf IgG-Globulin vom Mensch oder Kaninchen wie nicht erhitzte. Im letzteren Fall verursacht die nicht inaktivierte Neuraminidase zusätzlich eine deutlichere Überschneidung der beiden Präzipitationslinien unter Verkürzung der anodenwärts liegenden Präzipitatlinie (s. Abbildung 7).



Abbildung 7: Immunelektrophorese von IgG-Globulin
(Mensch) nach Behandlung mit gekochtem
bzw. ungekochtem Diphthin

Zusammenfassend ist in dem Immuno-Pherogramm der Abbildung 8 der Einfluß von (jeweils 5 min. auf 100°C) erhitztem RDE und Diphthin sowie von ungekochtem Diphthin auf ein menschliches Normalserum, jeweils nach 6-std. Inkubierung bei 37°C , demonstriert: Gegenüber den mit erhitztem RDE erhaltenen Befunden, die mit denen einer normalen Serumelektrophorese völlig übereinstimmen, bewirkt erhitztes Diphthin lediglich eine Aufspaltung der γ -Globuline, nicht erhitztes jedoch zusätzlich eine deutliche Verschiebung der Präzipitationslinien verschiedener Serumproteine, insbesondere von α_1 -Antitrypsin (1),

Transferrin (2) und Hämopectin (3). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß bei der Hämolyseeschutzwirkung bzw. IgG-Globulinspaltung durch Diphtin dessen Belastung mit Neuraminidase keine Rolle spielt.

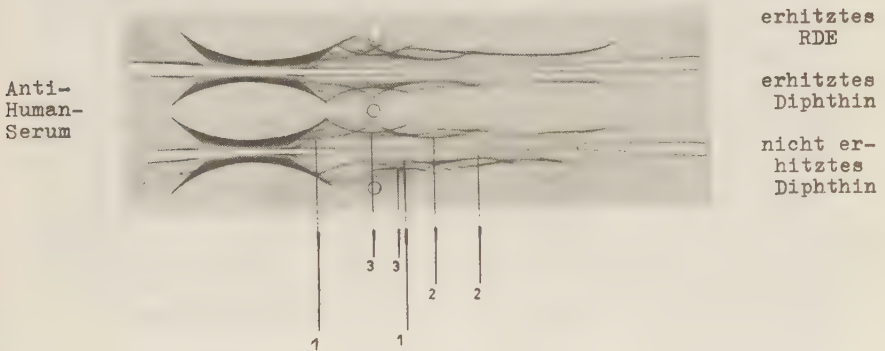


Abbildung 8: Immunelektrophorese eines menschlichen Normalserums nach Inkubation mit erhitztem RDE und Diphtin sowie nicht erhitztem Diphtin

F. Beeinflussung des Diphtineffekts auf IgG-Globulin durch Cystein

Nach Erfahrungen von SCHIFF und WEISE verschiebt sich durch Zusatz von Cystein zum Diphtin/IgG-Globulin-Gemisch und nachfolgender Ansäuerung das Mengenverhältnis der beiden bei der Gelfiltration eluierten Bruchstücke: Der in der Abbildung 1a und b als $^{di}F_c$ bezeichnete kleinere zweite Peak wurde auf Kosten des größeren, ersten Peaks $^{di}F(ab)_2$ vermehrt und es trat zusätzlich ein kleiner Vorgipfel auf (vgl. Abbildungen 9a und b). Merkwürdig war nun folgendes: Während das Inkubationsgemisch agar- und immunelektrophoretisch noch genau so reagierte wie ein entsprechendes Inkubationsgemisch ohne Cysteinzusatz, d.h. genau so wie die beiden ursprünglichen

Fragmente $^{di}F(ab)_2$ und ^{di}Fc , verhielt sich nach der Gelfiltration der 1. Gipfel zwar nach wie vor wie das ursprüngliche Fragment $^{di}F(ab)_2$, doch der nunmehr vermehrte 2. Gipfel enthielt zwei Fragmentquoten unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit und Antigenität. Die schnellere Quote erwies sich als ^{di}Fc , die langsamere hingegen hatte sich durch Halbierung von $^{di}F(ab)_2$ ergeben. Mit dieser Annahme stimmte die Erfahrung überein, daß dieses, als ^{di}Fab zu bezeichnende Bruchstück offenbar nur ein etwa halb so großes Molekulargewicht wie $^{di}F(ab)_2$ besitzt und daher mit einer entsprechenden Verzögerung, d.h. gemeinsam mit ^{di}Fc (mit einem Molekulargewicht von 45.000 - 50.000), bei der Gelfiltration eluiert wurde. Ferner war bei der isolierten $^{di}Fab/^{di}Fc$ -Fraktion eines präzipitierenden IgG-Globulins vom Kaninchen der Verlust des bei $^{di}F(ab)_2$ noch vorhandenen Präzipitationsvermögens zu verzeichnen.

Falls sich die Annahme von SCHIFF und WEISE bestätigen sollte, könnte gefolgert werden, daß nach Behandlung mit Diphthhin die Disulfidbrücken des IgG-Globulinmoleküls für eine reduktive Sprengung durch Cystein empfindlich werden, wie es ähnlich nach einer teilweisen Proteolyse durch Papain der Fall ist (CEBRA, GIVOL, SILMAN und KATCHALSKI, 1961).

Um weitere Einblicke in den tatsächlichen Sachverhalt zu gewinnen, wurden daher vergleichende Spaltversuche an IgG-Globulin vom Mensch und Kaninchen mit Diphthhin bzw. Papain mit und ohne Cysteinzusatz durchgeführt.

Hierzu wurden jeweils IgG-Globulin und Diphthhin bzw. kristallines Papain im Verhältnis von 150 : 3 bzw. 1,5 mg in 10 ml Pufferlösung gelöst. Als Puffer verwendeten wir 0,1 M Na-Acetat, pH 5,5 bzw. 0,1 M Na-Phosphat, pH 7,0, jeweils mit Zusatz von 0,002 M EDTA, gegebenenfalls unter Zugabe von Cystein (0,01 M). Die Lösungen wurden in Gegenwart von Toluol 16 Std. bei 37°C inkubiert. Jeweils dieselben Pufferlösungen sind als Elutionsmittel für die Gelfiltration auf Sephadex G-100 verwendet worden.

Die Versuche erbrachten folgendes: Bei der Gelfiltration eines Inkubationsgemisches von IgG-Globulin und Diphthhin ergab sich durch Mitverwendung von Cystein (0,01 M) in saurem Milieu (0,1 M Na-Acetatpuffer, pH 5,5) die von SCHIFF und WEISE beschriebene Veränderung des Elutionsbildes (s. Abbildungen 9a u.b.).

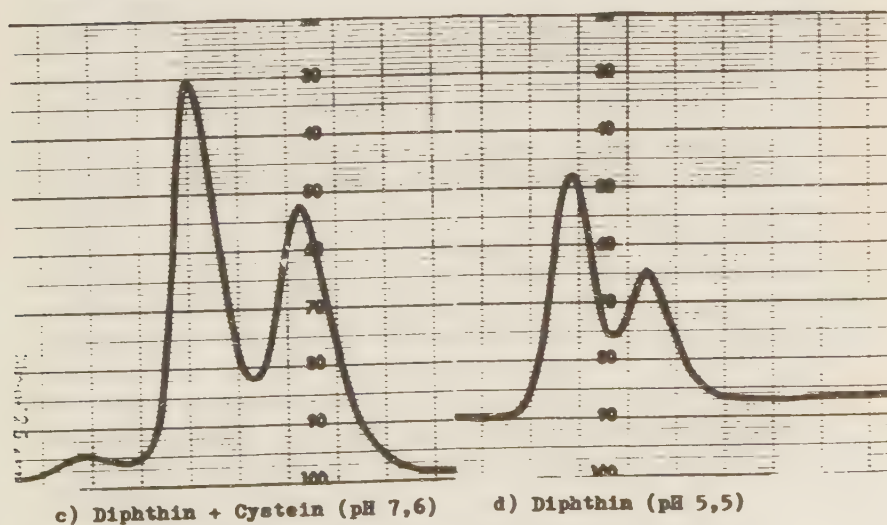
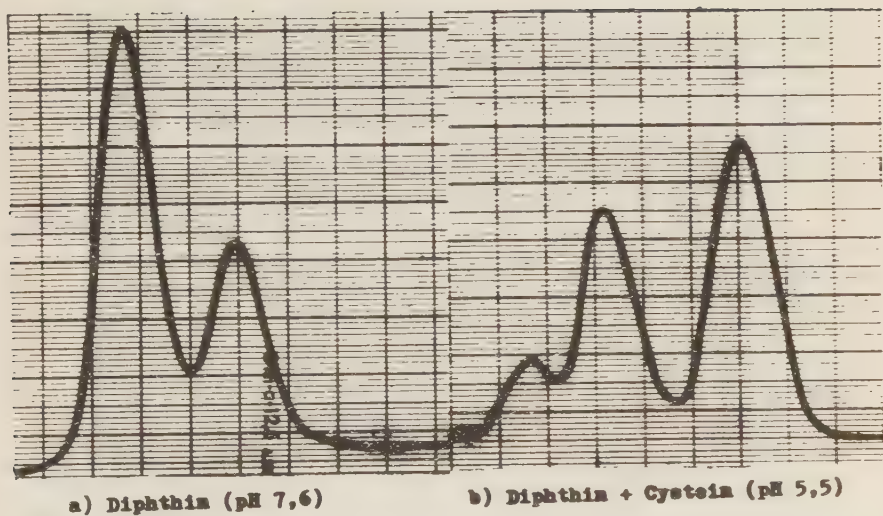


Abbildung 9: Gelfiltration (Sephadex G-100; Säule 50 x 3,5 cm) von IgG-Globulin (Mensch) nach Inkubierung mit Diphthim ohne und mit Cysteinzusatz bei pH 7,6 und 5,5.

Erfolgte hingegen die Diphthhin-Cystein-Einwirkung ohne Ansäuerung (0,01 M Na-Phosphat, pH 7,6), so bleibt dieser zusätzliche Spalteffekt aus (s. Abbildung 9c). Da andererseits dieser Effekt auch dann fehlte, wenn bei saurem pH (0,1 M Na-Acetat, pH 5,5) Diphthhin ohne Cystein verwendet wurde (s. Abbildung 9d), darf angenommen werden, daß Cystein lediglich im sauren bis - wie sich später zeigte - neutralen Milieu das Diphthhinfragment $^{di}F(ab)_2$ weiter zu spalten vermag. Es ergibt sich hiermit ein Gegensatz zu den Feststellungen von CEBRA, GIVOL, SILMAN und KATCHALSKI (1961), nach denen eine kurze Inkubierung von IgG-Globulin (vom Kaninchen) mit gereinigtem, wasserunlöslichem Papain bei pH 8,5 keine Fragmentierung bewirkt, nach Entfernung des Papains aber, trotz eines pH von 8,0, durch anschließenden Zusatz von Cystein eine Spaltung eintritt. Demnach bestünde bei der Fragmentierung von IgG-Globulin folgender Unterschied im Cysteineffekt: Bei Papainandaunung äußert er sich anscheinend sowohl im leicht alkalischen wie im schwach sauren Milieu; bei Spaltung mit Diphthhin hingegen setzt er einen leicht sauren bis neutralen pH-Wert voraus.

Mit unseren vorherigen Befunden stimmten die Ergebnisse überein, die wir bei gleichem methodischem Vorgehen mit IgG-Globulin vom Kaninchen erhielten. Wie der Abbildung 10 a und b zu entnehmen ist, stellten wir hierbei nach Gelfiltration (Sephadex G-100) eine im Prinzip gleichartige, jedoch noch stärker ausgeprägte Verschiebung der Elutionsverhältnisse fest: Gegenüber den beiden nach Einwirkung von Diphthhin allein erhaltenen Fragmenten $^{di}F(ab)_2$ und ^{di}Fc (in 0,1 M Na-Phosphat, pH 7,6) resultierte bei Mitverwendung von Cystein (in 0,1 M Na-Phosphat, pH 7,0) nach zwei kleinen Vorpeaks ein Hauptgipfel. Agar- und immunoelektrophoretisch konnten in diesem Hauptpeak wiederum zwei Fragmente von unterschiedlicher elektrophoretischer Motilität und Antigenität nachgewiesen werden, die ebenfalls ^{di}Fab und ^{di}Fc darstellen dürften (s. Abbildung 13).

Bei der von PORTER (1959) angegebenen Methode wird zur Spaltung von IgG-Globulin inaktives, als Hg-Dimer kristallisiertes Papain benutzt. Wie zahlreiche Autoren (KARUSH, 1959; NISONOFF und WOERNLEY, 1959; FRANKLIN, 1960; PUTNAM, HSIAO und

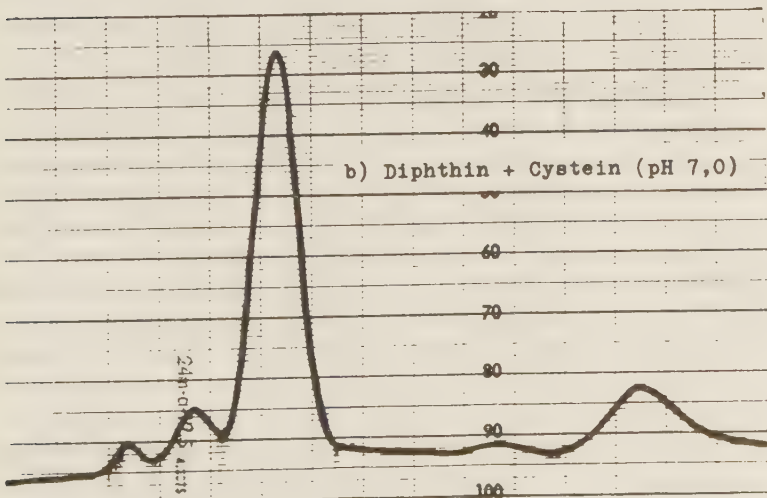
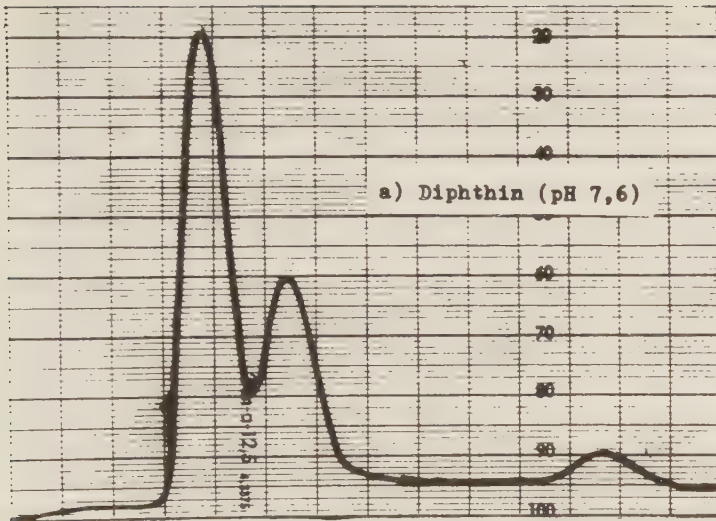


Abbildung 10: Gelfiltration (Sephadex G-100; Säule 50 x 3,5 cm) von IgG-Globulin (Kaninchen) nach Inkubierung mit Diphthrin ohne und mit Diphthinzusatz.

TAN, 1960; HANSON und JOHANSSON, 1962) berichten, werden weitgehend übereinstimmende Ergebnisse auch bei Verwendung von mehrfach umkristallisiertem Papain erhalten, das auch ohne Aktivierung durch Cystein wirksam ist. Für eigene Versuche haben wir ein derartiges Papainpräparat der Fa. SERVA, Heidelberg, verwendet.

In den Abbildungen 11a und b sind die nach Behandlung von IgG-Humanglobulin mit Papain, ohne und mit Cysteinzusatz, sowie mit Diphthin und Cystein (s. Abbildung 11c) nach Gel-filtration (Sephadex G-100) erhaltenen Elutionskurven einander gegenübergestellt. Es geht daraus hervor, daß durch Mitverwendung von Cystein sich die proteolytische Aktivität des Papains verstärkt. Annähernd die gleiche Exstinktionskurve wie im letzteren Falle erhielten wir nach Inkubierung desselben IgG-Humanglobulins mit Diphthin und Cystein. In allen drei Fällen ergaben sich dieselben Trennergebnisse nach 4 oder 16 Stdn. Inkubierung bei 37°C, woraus eine relative Stabilität der einzelnen Bruchstücke abgeleitet werden kann (vgl. PORTER, 1959). Die Hauptfraktionen in den Abbildungen 11b und c wurden in der Immunelektrophorese auf ihre Zusammensetzung geprüft.

Prinzipiell übereinstimmende Befunde ergaben sich bei entsprechenden Versuchen mit IgG-Globulin vom Kaninchen (s. Abbildungen 12a, b und c). Verglichen mit vorigen Abbildungen ist allerdings unverkennbar, daß - gleichermaßen bei Papain- und bei Diphthinbehandlung - die Ausbeute an den in der Hauptfraktion liegenden Fragmenten Fab und Fc bzw. ^{di}Fc und ^{di}Fab beim Mensch und Kaninchen verschieden groß ist bzw. sein kann (vgl. Abbildungen 11a, b und c). Offensichtlich können bei der Fragmentierung beider IgG-Globuline gewisse graduelle Unterschiede bestehen. Derartige Verschiedenheiten können auch aus Angaben anderer Autoren abgeleitet werden. So geben z.B. HSIAO und PUTNAM (1961) sowie DEUTSCH, STIEHM und MORTON (1961) an, daß bei der Papainandauung von IgG-Globulin vom Mensch zu 2 - 5 % Peptide mit einem Molekulargewicht von weniger als 5.000 anfallen, während PORTER (1964) beim IgG-Globulin vom Kaninchen von 10 % Verlust durch dialysierbare Peptide berichtet.

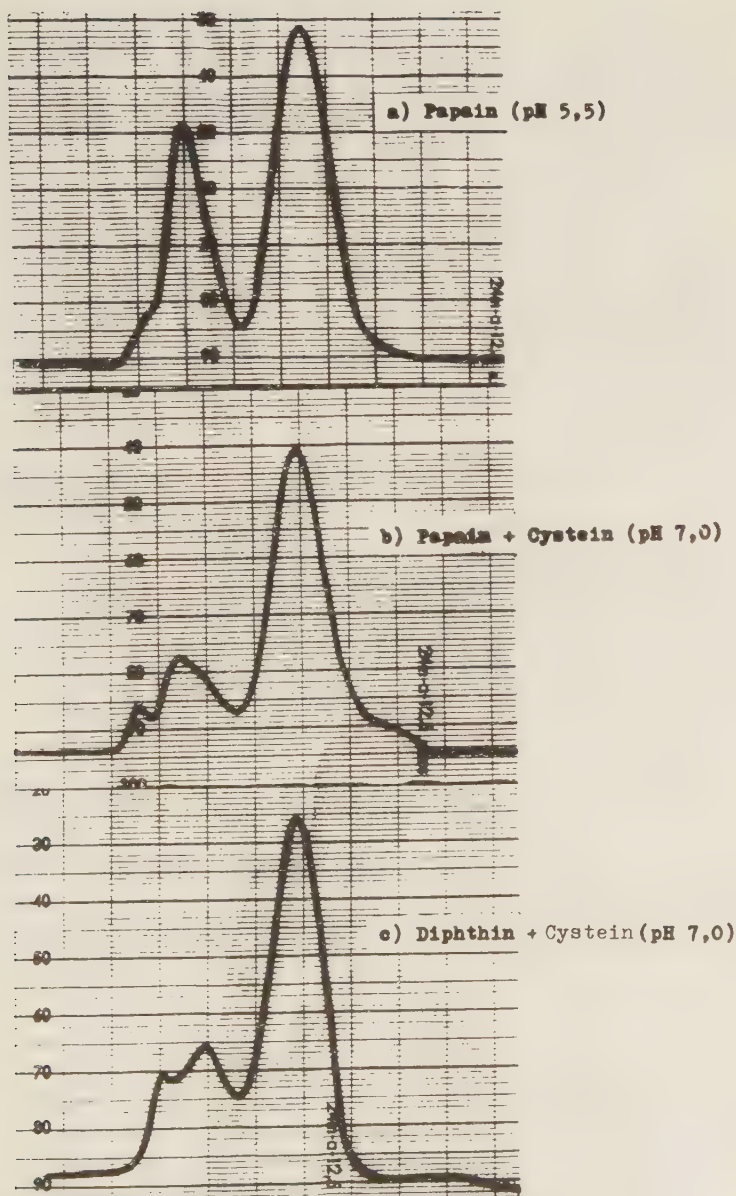


Abbildung 11: Gelfiltration (Sephadex G-100; Säule 50 x 3,5 cm) von IgG-Globulin (Mensch) nach Inkubierung mit Papain ohne Cystein und Papain bzw. Diphthrin mit Cysteinsusatz.

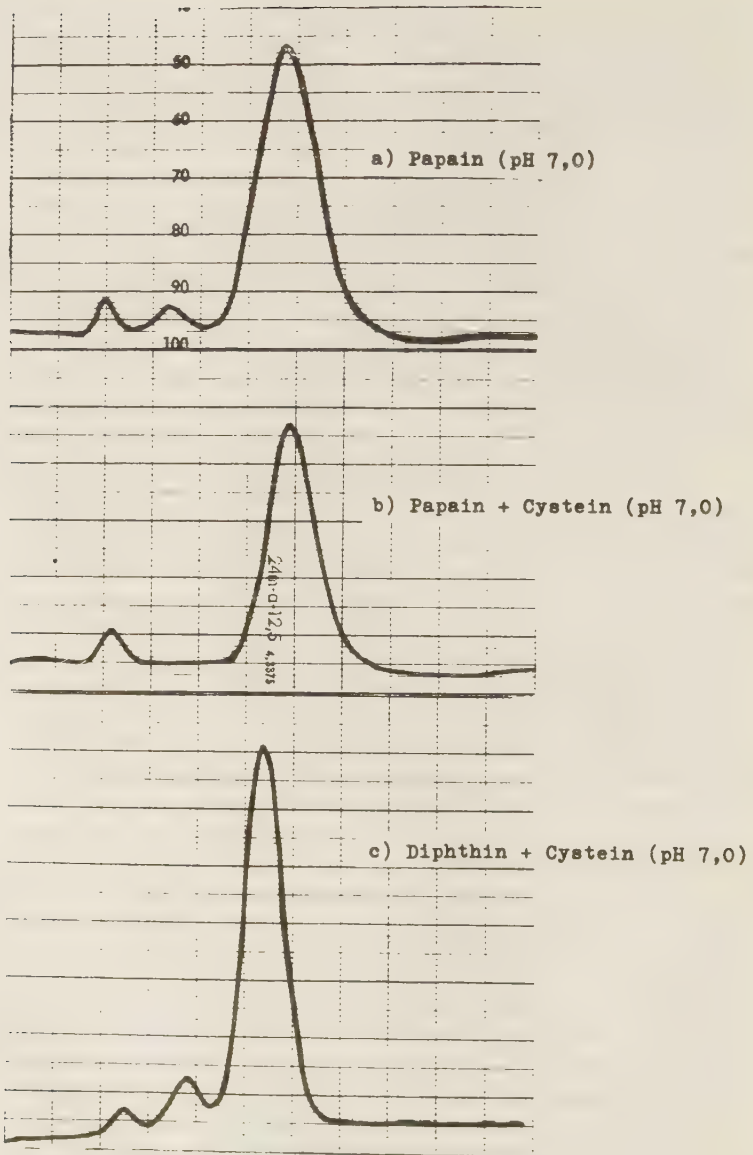


Abbildung 12: Gelfiltration (Sephadex G-100; Säule 50 x 3,5 cm) von IgG-Globulin (Kaninchen) nach Inkubierung mit Papain ohne Cystein und Papain bzw. Diphthin mit Cysteinzusatz.

Für eine weitgehende Identität der aus IgG-Globulin (vom Mensch und Kaninchen) mit Papain und Diphthin - jeweils mit Cysteinzusatz - erhältlichen Spaltprodukte Fc und ^{di}Fc bzw. Fab und ^{di}Fab sprechen nicht zuletzt die in der Abbildung 13 wiedergegebenen Befunde, die wir bei der immunoelektrophoretischen Untersuchung der Hauptfraktionen (siehe Diagramme 11b und c sowie 12b und c) erhielten.

Wegen der Ähnlichkeit der durch Papain + Cystein und Diphthin + Cystein erzielbaren Fragmentierung war zu erwarten, daß sich durch eine kombinierte Inkubierung von IgG-Globulin mit Papain, Diphthin und Cystein keine wesentlich differierenden Resultate einstellen würden - allerdings nur unter der Voraussetzung, daß keine kompetitive Hemmung beider Fermente eintritt.

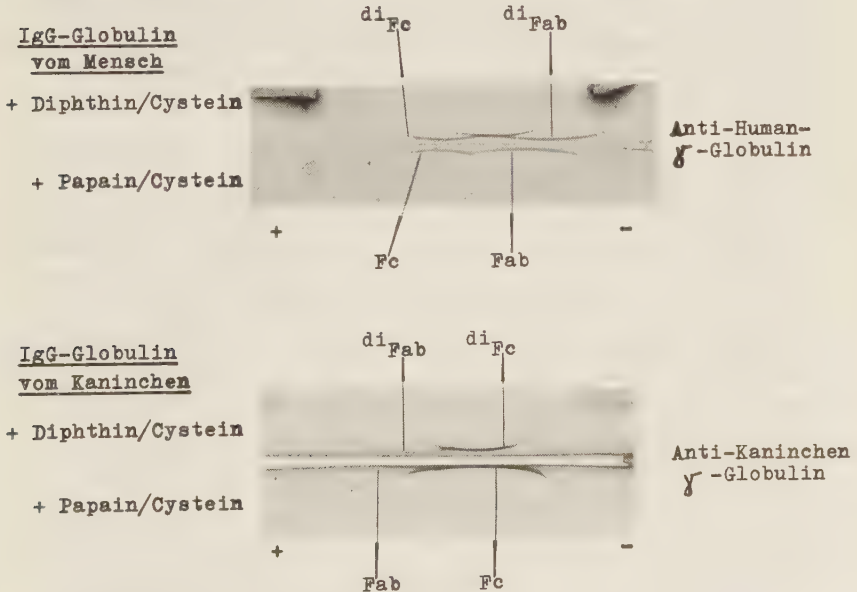


Abbildung 13: Immunoelektrophorese der nach Gelfiltration (Sephadex G-100; pH 7,0) jeweils erhaltenen Hauptfraktion von IgG-Globulin (vom Mensch und Kaninchen) nach 16 Stdn. Inkubierung mit Papain bzw. Diphthin jeweils mit Cystein-zusatz.

Bei einem derartigen Versuch wurden (in doppeltem Ansatz) 150 mg IgG-Globulin vom Mensch (jeweils dieselbe Charge) mit 1,5 mg kristallinem Papain und 3 mg Diphthine in 10 ml Pufferlösung (0,1 M Na-Phosphat, pH 7,0; 0,01 M Cystein; 0,002 M EDTA) gelöst und 16 Stdn. bei 37°C inkubiert. Bei der anschließenden Gelfiltration (Sephadex G-100) wurde der eine Ansatz auf einer kurzen Säule (50 x 3,5 cm) aufgetrennt. Das Elutionsdiagramm dieses Laufes gab Veranlassung, den zweiten Ansatz über eine lange Säule (90 x 3,5 cm) laufen zu lassen.

In der Abbildung 14a ist das bei Auftrennung auf der kurzen Säule erhaltene Elutionsdiagramm wiedergegeben. Vergleicht man diese Elutionskurve mit denen der Abbildungen 11b und c, so darf auf Grund der weitgehenden Übereinstimmung geschlossen werden, daß in Gegenwart von Cystein menschliches IgG-Globulin in annähernd der gleichen Weise durch Papain und Diphthine gespalten wird. Vermutlich würde sich dieselbe Übereinstimmung ergeben, falls beide Fermente nicht gleichzeitig, sondern jeweils getrennt nacheinander mit dem IgG-Globulin inkubiert würden.

Da in den beiden Abbildungen 11b und 14a der zweite Vorpeak einen allmählichen und gewölbten Kurvenabfall zeigte, dem möglicherweise eine Inhomogenität dieser Fraktion zugrundeliegt, ist durch Verwendung einer längeren Säule eine weitere Auftrennung versucht worden. Wie in der Abbildung 14b zu entnehmen ist, konnten hierdurch in dem zweiten Vorpeak 2 verschiedene Fraktionen nachgewiesen werden. Zusammen mit den im Hauptgipfel enthaltenen Fragmenten d_1^{Fab} und d_1^{Fc} und bei Ausßerachtlassung des Nachpeaks (vgl. Abbildung 1a und b), der teilweise auch aus zugesetztem Cystein besteht, resultierten bei diesem Fragmentierungs- und Trennverfahren insgesamt 5 verschiedene Fraktionen von IgG-Humanglobulin. Dabei kann es sich zum Teil um intermediäre Abbaustufen bei der Proteolyse handeln.

Mit vorstehend berichteten Ergebnissen sind zahlreiche Ansatzpunkte für eingehende Untersuchungen gegeben. Eine vorrangige Aufgabe wird hierbei sein, mittels Ionenaustauschchromatographie (an CM-Cellulose) die im Hauptpeak enthaltenen Fragmente d_1^{Fab} und d_1^{Fc} zu trennen und endgültig zu definieren.

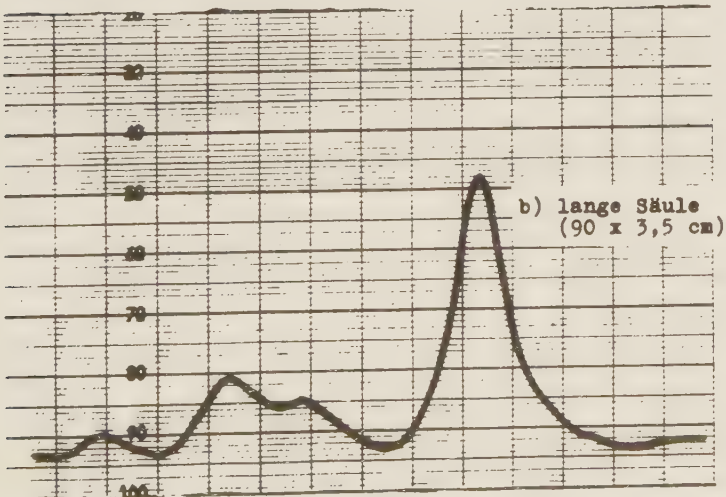
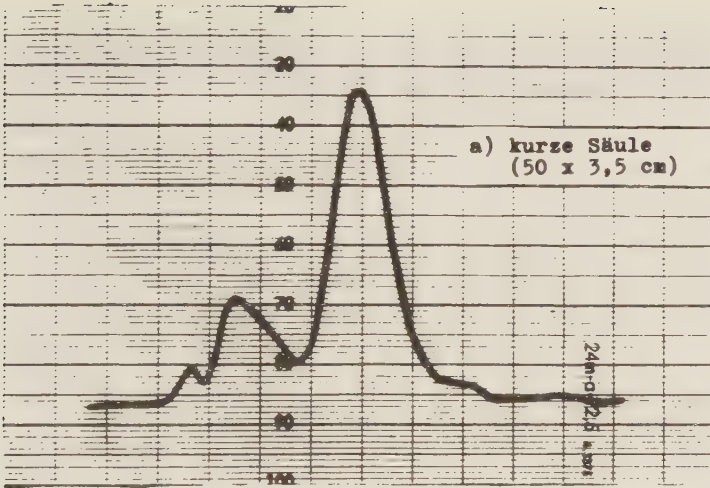


Abbildung 14: Gelfiltration (Sephadex G-100) von IgG-Globulin (Mensch) nach Inkubierung mit Papain, Diphthhin und Cystein mittels kurzer (50 x 3,5 cm) und langer (90 x 3,5 cm) Säule.

G. Serologische Eigenschaften der $^{di}F(ab)_2$ - und ^{di}Fab -Fragmente vom IgG-Immunglobulin vom Mensch und Kaninchen

Bei Antikörperbestimmungen an den aus IgG-Globulin von immunisierten Menschen (3) und Kaninchen (2) gewonnenen Fragmenten $^{di}F(ab)_2$ und ^{di}Fc hatten SCHIFF und WEISE Antikörperaktivität ausschließlich bei $^{di}F(ab)_2$ nachgewiesen, und zwar in der Art kompletter Antikörper. Diese Feststellung entspricht der von zahlreichen Autoren (NISONOFF, WISSLER, LIPMAN und WOERNLEY, 1960; FRANKLIN, 1960; CEBRA, GIVOL, SILMAN und KAT-CHALSKI, 1961; FUDENBERG, MANDY und NISONOFF, 1962; SPIEGELBERG und WEIGLE, 1964) gefundenen Antikörperaktivität des vergleichbaren, als $F(ab')_2$ bezeichneten 5S-Pepsinfragmentes. Gegenüber dem jeweils ursprünglichen IgG-Globulin waren nach der Fragmentierung mittels Diphthin im allgemeinen Titereinbußen bis zu 2 Verdünnungsstufen (Faktor 2) zu verzeichnen (Diphtherie-Antitoxin und Anti- A_1 Hämagglutinin vom Mensch sowie Anti-Human-Präzipitin und Anti-Schaf-Hämagglutinin vom Kaninchen). Bei einem menschlichen Toxoplasmose-Serum erlitten die SFT-Antikörper eine erhebliche Titereinbuße und bei vorgenanntem Anti-Schaf-Kaninchenserum waren überhaupt keine Hämolysintiter mehr nachweisbar. Auch letztere Beobachtung deckt sich mit den Erfahrungen verschiedener Autoren, wonach das 5S-Pepsinfragment sein Komplementbindungsvermögen verloren hat bzw. wonach diese Fähigkeit an das Pepsinfragment Fc gebunden ist (TARANTA, WEISS und FRANKLIN, 1961; COHEN und PORTER, 1964).

Für entsprechende eigene Versuche sind ein Anti- A_1 -Immunserum vom Mensch (Nativtiter : Hämagglutinine 1 : 32.000, Hämolysine 1 : 32) und ein gepooltes Anti-Schafblut-Immunserum von 6 Kaninchen (Nativtiter : Hämagglutinine 1 : 32.000, Hämolysine 1 : 256.000) benutzt worden.

Für die Titerbestimmungen sind die isolierten IgG-Globuline und $^{di}F(ab)_2$ - und ^{di}Fc -Fraktionen in ungefährer Relation zu ihrem gewichtsmäßigen Vorkommen im nativen Serum bzw. ihrem Anfall bei der Spaltung von IgG-Globulin 1,2%ig bzw. 0,8%ig und 0,4%ig in physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen worden. Vor der Auswertung wurden diese Lösungen und das native Serum 30 min. bei 56°C inaktiviert. Beim Hämagglutinationstest fügten

wir zu jeweils 0,15 ml der austitrierten Lösungen 0,15 ml einer 1%igen Suspension von A₁- bzw. Schaf-Erythrozyten hinzu. Nach 1-std. Inkubierung bei Zimmertemperatur und schwachem Zentrifugieren wurde abgelesen. - Bei der Hämolyse-Reaktion ist obigen Serumverdünnungen vor Zugabe der Blutkörperchen jeweils 0,15 ml auf 1/20 verdünntes Komplement zugesetzt worden; die Ablesung erfolgte nach 20 min. Aufenthalt im Wasserbad (37°C).

Wie der Tabelle 4 zu entnehmen ist, konnten bei diesen Versuchen die Angaben von SCHIFF und WEISE bestätigt werden: Beim Menschen- und Kaninchenserum hatte die Diphthinbehandlung der nativen Seren und der daraus isolierten IgG-Globuline zu einer geringfügigen Reduktion der Hämagglutinititer geführt. Die beim Anti-A₁ auf 1 : 2.000 und beim Anti-Schafblut auf 1 : 8.000 reduzierten Titer wurden jeweils sowohl bei den IgG-Globulin/Diphthin-Gemischen als auch bei den hieraus isolierten Fragmenten $^{di}F(ab)_2$ festgestellt. Der geringfügige Hämagglutinationseffekt der beiden ^{di}Fc -Fragmente (1 : 2 bzw. 1 : 32) darf wohl auf einen kleinen, nicht abgetrennten Anteil an $^{di}F(ab)_2$ zurückgeführt werden. (Dieser Ansicht sind auch FUDENBERG, MANDY und NISONOFF (1962) hinsichtlich ihrer mit den beiden Papainfragmenten gemachten entsprechenden Beobachtungen.) Ferner resultierte nach der Diphthinbehandlung der nativen Seren bzw. der isolierten IgG-Globuline bei den Hämolysinen eine außerordentlich starke bzw. völlige Titer einbuße.

In diesem Zusammenhang sei bemerkt, daß die nach Diphthinbehandlung von nativem Serum festgestellte, mehr oder weniger starke Titerverminderung der Hämagglutinine und Hämolysine in Gegensatz zu den von SCHIFF sowie von SEEMÜLLER gemachten Erfahrungen steht. Auch nach vielstündiger Inkubierung mit diphthinhaltigen Kulturfiltraten, allerdings meist bei Zimmertemperatur, konnte nämlich SCHIFF (1964e) nie eine nennenswerte Beeinflussung der Hämagglutinin- und Hämolysintiter konstatieren. Überdies teilte er mit (SCHIFF, 1964c), daß manche Anti-Schafblut-Immunseren (vom Kaninchen) nach Inkubierung mit Diphthin im serologischen Maustest nur eine Titerreduktion von 1-2 statt üblicherweise von 4-7 Verdünnungsstufen zeigten. Darüber hinaus wirkte sich der Diphthineffekt graduell unterschiedlich

Immunserum	natives Serum	natives Serum +Diphthin	Isoliertes IgG-Globulin (1,2%)	Isoliertes IgG-Globulin + Diphthin (1,2%)	di _{F(ab)} 2 (0,8%)	di _{Fc} (0,4%)
von Mensch	Anti-A ₁ -Hämagglutinin	1:32000	1:8000	1:4000	1:2000	1:2
	Anti-A ₁ -Hämolyse	1:32	0	1:16	0	0
von Kaninchen	Anti-Schaf-Hämagglutinin	1:32000	1:8000	1:8000	1:8000	1:32
	Anti-Schaf-Hämolyse	1:256000	1:2048	1:8000	0	0

Tabelle 4: Hämagglutinin- und Hämolyseintiter eines Anti-A₁-Immunserums vom Mensch und eines Anti-Schafblut-Immunserums von Kaninchen und deren isolierten IgG-Globulinfraktionen und Diphthinfragmenten di_{F(ab)}2 und di_{Fc}.

gegenüber spezifisch verschiedenartigen Hämagglutininen bzw. Hämolsinen desselben Immunserums aus. Dieselbe Beobachtung hatte auch SEEMÜLLER (1943, 1944, 1945, 1949b, 1954) bei Verwendung von Di-Toxin oder Di-Toxoid gemacht, und diese Erfahrung war letztlich der Ausgangspunkt seiner Untersuchungen über das sog. SEEMÜLLER-Phänomen. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse besitzen wir noch nicht. Möglicherweise beruhen diese Unterschiede auf einer verschiedenen Wirksamkeit des Diphthins gegenüber den Immunseren, insbesondere hinsichtlich einer Verschiedenheit im Alter oder Immunisierungsgrad der Seren und nicht zuletzt individueller Unterschiede (Heterogenität) im IgG-Globulinmolekül. Mit letzterer Möglichkeit hatten zudem HSIAO und PUTNAM (1961), FAHEY (1962) sowie COHEN und PORTER (1964) im Einzelfall abweichende Spalteffekte des Papains erklärt.

Die von PORTER (1959) getroffene Feststellung, daß das Papainfragment Fab von IgG-Globulin vom Mensch oder Kaninchen lediglich die Aktivität 'inkompletter' bzw. 'univalenter' Antikörper besitzt, ist in der Folgezeit von einer Vielzahl von Autoren bestätigt worden (FRANKLIN, 1960; EDELMAN, HEREMANS, HEREMANS und KUNKEL, 1960; MANDY, RIVERS und NISONOFF, 1961; FUDENBERG, MANDY und NISONOFF, 1962; FLEISCHMAN, PORTER und PRESS, 1963; GOODMAN, 1964; UTSUMI und KARUSH, 1964 u.a.m.). Die gleiche Aussage gilt für die mit Fab vergleichbaren Bruchstücke, die durch Einwirkung reduzierender Substanzen wie Cystein oder Mercaptoäthanol (in relativ geringen Konzentrationen) auf das 5S-Pepsinfragment entstehen (NISONOFF, WISSLER, LIPMAN und WOERNLEY, 1959; FUDENBERG, MANDY und NISONOFF, 1962). Im Hinblick auf die Ähnlichkeit dieses 5S-Pepsinbruchstückes mit dem Diphthinfragment $^{di}F(ab)_2$ war die Annahme von SCHIFF und WEISE durchaus berechtigt, daß auch am Diphthinbruchstück Cystein eine Reduktion und damit die gleiche Spaltwirkung ausübt. Zudem hatten sie festgestellt, daß das auf diese Weise dann entstehende Halbfragment ^{di}Fab ein etwa halb so großes Molekulargewicht wie $^{di}F(ab)_2$ besitzt und die Aktivität kompletter Antikörper (Präzipitine) verloren hatte (s.S. 30).

Wegen der Bedeutung letzterer Befunde haben wir mit 4 verschiedenen Methoden Antikörpertiterbestimmungen an vorigem IgG-Globulin aus Anti-Schafblut-Immunserum vom Kaninchen durchgeführt, und zwar nach 16-std. Inkubierung (37°C) mit Papain und Cystein bzw. Diphthin und Cystein.

Bei den vier als Rörchenverdünnungstest durchgeführten Reaktionen wurden die auf S. 40 angegebenen Mengenverhältnisse eingehalten. Beim Hämagglutinations- und Blocking-Test sind 1%ige, beim Konglutinations- und Antiglobulin-Test 2%ige Suspensionen von Schaf-Erythrozyten verwendet worden. Für die Konglutination wurde anstelle von physiologischer NaCl-Lösung inaktiviertes Schafserum als Verdünnungs- und Suspensionsmilieu (Supplement) benutzt. Beim Anti-Globulin-Test wurden nach 1-std. Inkubierung einer Hämagglutinations-Testreihe die in den Rörchen befindlichen sensibilisierten Erythrozyten 4-mal mit NaCl-Lösung gewaschen und anschließend den einzelnen Erythrozytensedimenten jeweils 0,1 ml eines präzipitierenden Anti-Kaninchenglobulin-Serums vom Schaf hinzugegeben. Für den Blocking-Test sind die sensibilisierten Erythrozyten 2-mal mit NaCl-Lösung gewaschen worden. Darauf wurden je Rörchen 0,15 ml eines auf 1/256 verdünnten Anti-Schaf-Hämagglutinins (vom Kaninchen) zugesetzt. (Diese Verdünnung bewirkte in der Kontrolle gerade noch einen starken (+++) Hämagglutinationseffekt.) Die Reaktionsgemische aller drei Methoden sind 1 Std. bei 37°C inkubiert bzw. nachinkubiert worden. Nach kurzem schwachem Zentrifugieren der Rörchen erfolgte die Ablesung.

Die bei diesen serologischen Untersuchungen bestimmten Anti-Schafbluttiter sind in der Tabelle 5 aufgeführt. Durch die Behandlung des IgG-Globulins mit Papain oder Diphthin, jeweils mit Cysteinzusatz, fiel der ursprüngliche Hämagglutinititer in den nicht dialysierten Inkubationsgemischen auf 64 bzw. 128 ab. Da nach Dialyse (24 Stdn. gegen NaCl) nur noch Resttiter von 2 bzw. 4 vorhanden waren, sind durch die Dialyse offensichtlich irgendwelche agglutinationsfördernde Substanzen entfernt worden. In den beiden dialysierten Inkubaten, d.h. in Gemischen von Fab und Fc bzw. von vermutlich ^{di}Fab und ^{di}Fc, sind mittels des Konglutinin-, Anti-Globulin- und Blocking-Tests jeweils weitgehend übereinstimmende Titer von inkompletten Anti-Schafblut-Antikörpern nachgewiesen worden (8.000 bzw. 512 bzw. 16). Hierbei seien die herausragenden Befunde des Konglutinationstestes besonders betont, da unseres Wissens bei vergleichbaren Untersuchungen anderer Autoren dieses Verfahren nicht angewandt wurde.

	Hämagl.- Test (NaCl-L.)	Konglut.- Test (Schaf- Serum)	Anti-Glob.- Test (Anti- Kaninchen vom Schaf)	Blocking- Test
IgG-Globulin + <u>Papain</u> + Cystein	64 2	. 8000	. 512	. 16
IgG-Globulin + <u>Diphthin</u> + Cystein	128 4	. 16000	. 512	. 32

Tabelle 5: Mittels Hämaggglutinations-, Konglutinations-, Antiglobulin- und Blocking-Test ermittelte Anti-Schafblut-Titer von IgG-Globulin vom Kaninchen (immunisiert mit Schafblutkörperchen) nach 16-std. Inkubierung mit Papain bzw. Diphthin jeweils mit Cysteinzusatz.

Die übereinstimmenden serologischen Befunde, die bei diesen Vergleichsuntersuchungen mit 4 verschiedenen Methoden erhalten wurden, sprechen ebenfalls für eine weitgehende Identität der Papain- und Diphthinfragmente Fab bzw. $diFab$. Falls die Richtigkeit dieser Ansicht durch Molekulargewichtsbestimmungen von $diFab$ beim Mensch und Kaninchen bestätigt werden kann, ergibt sich, daß durch Behandlung von IgG-Globulin mit Papain, Pepsin oder Diphthin, jeweils bei Mitverwendung von Cystein, strukturell und serologisch weitgehend übereinstimmende Antikörperfragmente von der Art Fab resultieren. Deutliche Unterschiede bestehen hingegen ohne Cysteinzusatz. Der hierbei vorliegende Sachverhalt sei in der Abbildung 15 am PORTERschen Schema des IgG-Globulinmoleküls verdeutlicht. Nach dem Stand unserer derzeitigen Kenntnisse

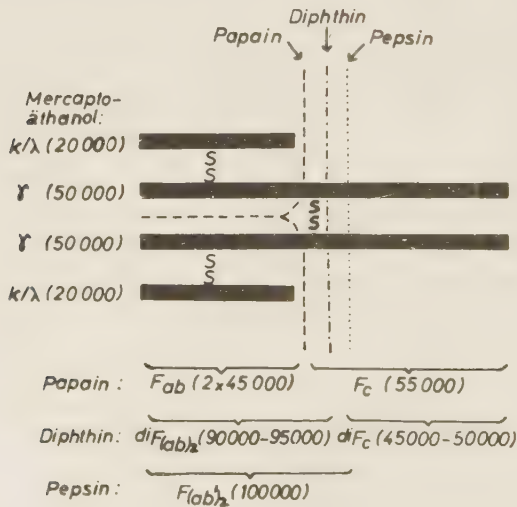


Abbildung 15: Spaltwirkung von Papain, Pepsin und Diphthin (jeweils ohne Cysteinzusatz) auf IgG-Globulin (Strukturschema des IgG-Globulinmoleküls nach PORTER, 1962)

wäre es denkbar, daß die durch Diphthin bewirkte Spaltung des IgG-Globulinmoleküls in einem Molekülbezirk erfolgt, der zwischen den Spaltlinien des Papains und des Pepsins liegt. Auch hinsichtlich der Größe und Art der entstehenden Molekülfragmente nimmt Diphthin eine Mittelstellung zwischen den beiden anderen Fermenten ein (s. Abbildung 16): Es entsteht nämlich, ähnlich wie durch Pepsinbehandlung, doch im Unterschied zur Papainspaltung, ein "komplettes" $(ab)_2$ -Antikörperfragment und, ähnlich wie nach Papaineinwirkung, aber im Gegensatz zur Pepsinspaltung, ein vollständiges c-Fragment.



Abbildung 16: Fragmente des IgG-Globulinmoleküls durch Behandlung mit Papain, Pepsin und Diphthin (jeweils ohne Cysteinzusatz)

IV. Besprechung

=====

Vorstehend berichtete Ergebnisse sind durch Untersuchungen einiger Einzel- oder Mischseren bzw. den daraus gewonnenen IgG-Globulinen erhalten worden. Dabei festgestellte graduelle Unterschiede im Diphthineffekt dürften hauptsächlich auf primär vorhandene Unterschiede im Substrat, insbesondere auf eine Heterogenität des IgG-Globulins zurückzuführen sein. Derartige Unterschiede sind auch bei der Spaltung von IgG-Globulin mittels Papain gefunden worden (HSIAO und PUTNAM, 1961; FAHEY, 1962; COHEN und PORTER, 1964). So hatten wir bei den Diphthinfragmenten aus IgG-Globulin vom Mensch Sedimentationskonstanten für $^{di}F(ab)_2$ in einem Bereich von 5,26 - 5,75 und für ^{di}Fc von 3,25 - 3,4 erhalten, während z.B. die von FAHEY (1962) berichteten S_{20} -Werte für die entsprechenden Papainfragmente bei Fab zwischen 3,5 und 3,9 und bei Fc zwischen 3,4 und 3,9 liegen. Auch beim Pepsinfragment $F(ab')_2$ aus IgG-Globulin vom Mensch differieren die berichteten S_{20} -Werte, und zwar von 4,6 - 5,18 (FUDENBERG, MANDY und NISONOFF, 1962; NISONOFF und DIXON, 1964).

Im Gegensatz hierzu scheint IgG-Globulin vom Kaninchen einer Spaltung sowohl durch Papain (DEUTSCH, STIEHM und MORTON, 1961) wie durch Diphthin zugänglicher und die entstehenden Fragmente einheitlicher zu sein, was sich in deutlich geringeren Schwankungsbreiten der Sedimentationskonstanten äußert. Nach FAHEY (1962) liegen die Sedimentationskonstanten für die Papainfragmente aus IgG-Globulin vom Kaninchen bei $S_{20} = 3,55$ - 3,6 für Fab und $S_{20} = 3,4$ für Fc; für das 5S-Pepsinfragment gaben FUDENBERG, MANDY und NISONOFF (1962) einen S_{20} -Wert von $4,8 \pm 0,2$ an. Wir stellten für die entsprechenden Diphthinfragmente S_{20} -Werte von 5,0 - 5,1 für $^{di}F(ab)_2$ und 3,4 - 3,8 für ^{di}Fc fest.

Im Vergleich zu den beiden für eine Spaltung von IgG-Globulin am häufigsten verwendeten Fermenten Papain und Pepsin nimmt Diphthhin eine bemerkenswerte Zwischenstellung ein. Während mittels Papain neben einem Fc-Fragment zwei weitgehend identische Fab-Bruchstücke und mittels Pepsin neben zahlreichen dialysierbaren Bruchstücken von Fc' ein großes F(ab')₂-Fragment erhalten werden, resultieren nach Behandlung mit Diphthhin, ähnlich wie bei Papain, ein intaktes, dem Fc entsprechenden Fragment, und ähnlich wie bei Pepsin ein "komplettes" mit F(ab')₂ vergleichbares Fragment (s. Abbildung 16). Hierzu sei bemerkt, daß zur Erreichung dieser Effekte alle drei Fermente keinen Cysteinzusatz erfordern. Allerdings benötigt Papain zur Auswirkung seines Spalteffektes Sulfhydrylgruppen, die bei saurem bis neutralem pH in reduziertem Zustand in seinem Molekül vorliegen (SCHULTZE und HEREMANS, 1966). Nach TRISTRAM und SMITH (1963) beträgt der Cystingehalt von Papain ca. 4 %. Im Vergleich hierzu besitzt Pepsin nur einen Cystingehalt von 1,25 % und Diphthhin an schwefelhaltigen Aminosäuren nur einen geringen Gehalt an Methionin (SCHIFF, 1964e). Bemerkenswerterweise ist Diphthhin auch in Gegenwart von Cysteinhemmern wie Jodacetamid wirksam (SCHIFF und WEISE, unveröffentlicht).

Offensichtlich spalten die verschiedensten proteolytischen Enzyme das IgG-Globulin im gleichen Molekülbereich. Ein bestimmter Bezirk der H-Kette ist demnach besonders leicht einer Spaltung zugänglich. Da ohne Cysteinzusatz, allerdings nach längerer Einwirkung, lediglich durch Papain eine Weiterspaltung bzw. Fragmenthalbierung zum Fab erfolgt (CEBRA, GIVOL, SILMAN und KAT-CHALSKI, 1961), wird angenommen, daß die beiden H-Ketten des IgG-Globulinmoleküls nicht durch 3, sondern nur durch eine einzige Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, die im kritischen Bereich der proteolytischen Spaltbarkeit liegt (CEBRA und Mitarbeiter, 1961; GOODMAN, 1964; PALMER und NISONOFF, 1964).

Diese Disulfidbrücke müßte allerdings außerhalb der H-Kettenanteile der beiden Fab-Fragmente lokalisiert sein, da hierdurch eine Erklärung für das Intaktbleiben von Fc gegeben wäre (NISONOFF und DIXON, 1964). Falls diese Annahme zuträfe, könnte

man folgern, wie dies bereits in der Abbildung 15 berücksichtigt worden ist, daß der durch Diphthhin und Pepsin bewirkte Molekülbruch auf der "anderen Seite" der Disulfidbrücke, d.h. entgegengesetzt der Papainspaltlinie, erfolgt. Da das Molekulargewicht von Diphthhinfragment ^{di}Fc kleiner als von Papainfragment Fc und das von Diphthhinfragment $^{di}F(ab)_2$ kleiner als von Pepsinfragment $F(ab')_2$ und größer als die Summe der Molekulargewichte beider Papainfragmente Fab ist, könnte vermutet werden, daß die Spaltlinie des Diphthhins zwischen den Spaltlinien der beiden anderen Fermente liegt.

Eine solche Vorstellung stünde im Einklang mit der Annahme von FLEISCHMAN, PORTER und PRESS (1963), wonach der Kohlehydratgehalt von IgG-Globulin hauptsächlich im mittleren Bereich der H-Ketten vorliegt. In Übereinstimmung hiermit und mit den Ergebnissen von PORTER (1959) fanden wir, daß nach Spaltung von IgG-Globulin vom Kaninchen mittels Diphthhin zwei Drittel der reduzierenden Kohlehydrate beim Fragment ^{di}Fc , das restliche Drittel beim Fragment $^{di}F(ab)_2$ liegen. Bei den Diphthhinfragmenten aus IgG-Globulin vom Mensch war die Verteilung umgekehrt, was von den Angaben anderer Autoren (FAHEY, 1962) insofern etwas abweicht, als diese im allgemeinen bei Papainfragmenten von IgG-Globulin beim Mensch und Kaninchen die gleichen Verhältnisse feststellten. Diese Abweichungen könnten durch Unterschiede in der Methodik, durch individuelle oder speciesbedingte bzw. molekülstrukturelle Unterschiede des IgG-Globulins mitbedingt sein (ROSEVEAR und SMITH, 1962; PORTER und PRESS, 1964). Damit dürften auch gewisse Abweichungen in der Aminosäurezusammensetzung der Papain- und Diphthhinfragmente zusammenhängen.

Nach übereinstimmenden Berichten besitzt das Pepsinfragment $F(ab')_2$ zwar noch komplette Antikörperaktivität (Agglutinine, Präzipitine), hat jedoch die Fähigkeit zur Komplementbindung und damit zur Lysis verloren (FUDENBERG, MANDY und NISONOFF, 1962; SPIEGELBERG und WEIGLE, 1964). Die Erklärung liegt darin, daß das Komplementbindungsvermögen an das Papainfragment Fc gebunden ist, das bei der Pepsinandauung zerstört wird (PORTER, 1959; TARANTA, WEISS und FRANKLIN, 1961; FRANKLIN

und OVARY, 1964). Das gleiche serologische Verhalten fanden wir beim vergleichbaren Diphthinfragment $^{di}F(ab)_2$ aus IgG-Globulin vom Mensch und Kaninchen.

Durch Cysteinzzusatz entstehen bei der Spaltung von IgG-Globulin mittels Pepsin oder Diphthin die Halbfragmente Fab' bzw. ^{di}Fab , die gleichermaßen nur noch die Aktivität inkompletter, blockierender Antikörper besitzen. Diese Bruchstücke haben also die gleichen antigenbindenden Eigenschaften wie die vergleichbaren Papainfragmente Fab. Trotz der teilweisen Ähnlichkeit im serologischen Verhalten können diese Antikörperbruchstücke jedoch nicht den natürlich vorkommenden inkompletten bzw. "univalenten" Antikörpern gleichgesetzt werden, da nur letztere das Molekulargewicht des intakten IgG-Globulins besitzen und im Falle eines Hämagglutinins spezifisch entsprechende, papainisierte Blutkörperchen zu agglutinieren vermögen. Die künstlich hergestellten inkompletten bzw. "univalenten" Antikörperbruchstücke sind dazu nicht imstande (FUDENBERG, MANDY und NISONOFF, 1962; GOLD und HOLLÄNDER, 1966). Während FUDENBERG und Mitarbeiter mit dem Papainfragment Fab auch in Supplement-Milieu (30 % Rinder-Albumin) keinen positiven Konglutinationstest erzielen konnten, haben wir im Falle eines Anti-Schaf-Hämagglutinins bei Verwendung von inaktiviertem Schafserum als Supplement eindeutig positive Reaktionen erhalten, und zwar sowohl bei diphthin- wie papain-behandeltem IgG-Globulin vom Kaninchen (s. Tabelle 5). Es bedarf noch einer Klärung, ob diese sich widersprechenden Befunde darauf zurückzuführen sind, daß wir keine reinen Fab-Fragmente, sondern nicht aufgetrennte, wenn auch dialysierte Gemische der Diphthinfragmente ^{di}Fab und ^{di}Fc bzw. der Papainfragmente Fab und Fc untersucht haben.

Eine andere Frage ist, ob für den Spalteffekt des Diphthins dessen Gehalt an Neuraminidase eine Bedeutung beizumessen ist. Wir möchten ^{dies} aus folgenden Gründen verneinen: Eine Diphthinlösung, deren Neuraminidaseanteil durch kurzfristiges Aufkochen weitgehend inaktiviert worden ist, besitzt noch denselben quantitativen Spalteffekt auf IgG-Globulin wie eine nicht erhitzte Lösung (s. Abbildungen 7 und 8). Andererseits ist bei anderen

Neuraminidasen, z.B. RDE oder solcher von *Clostridium perfringens*, weder ein Spalteffekt auf IgG-Globulin (SCHULTZE und SCHWICK, 1960; HEIDE und HAUPT, 1962; POPENOE und DREW, 1957) noch eine Hämolyseeschutzwirkung im Tierversuch (SCHIFF, unveröffentlicht) nachgewiesen worden. So besteht wenig Anlaß, auf Grund eventueller Spezifitätsunterschiede einzelner Neuraminidasen auf derart gravierende Differenzen im Neuraminidaseeffekt zu schließen. Zudem hat STÖRIKO (1964) gezeigt, daß durch eine Abspaltung von Neuraminsäure mittels RDE oder Säure keine grundsätzliche Strukturänderung von Proteinen eintritt, wie sie eine Spaltung bedeuten würde. Was die von anderen Autoren berichteten Unterschiede in der Hemmwirkung auf die Hämagglutination z.B. durch Influenzavirus betrifft, die bei RDE stark ausgeprägt und bei Neuraminidase aus *Corynebacterium diphtheriae* nicht oder nur wenig vorhanden sein soll (POULIK, 1961; HEIDE und HAUPT, 1962; WARREN und SPEARING, 1963), so dürften sie auf einen unterschiedlichen Gehalt der betreffenden Präparate an Neuraminidase zurückzuführen sein. Denn SCHIFF (1964e) konnte mittels einer Diphthinlösung, die einen sehr hohen Neuraminidasegehalt besaß, noch bei 0,006 % Diphthinkonzentration eine völlige Hämagglutinationshemmung von A PR8-Influenzavirus feststellen; entsprechende Vergleichsversuche mit erhitzter Diphthinlösung fehlen allerdings.

Mit dem Nachweis der Diphthinwirkung als einem fermentativen Vorgang ist eine neue Deutung des von SEEMÜLLER beschriebenen und von SCHIFF als Diphthineffekt geklärten Hämolyseeschutzphänomens gegeben. Zwar ist es richtig, im Sinne SCHIFFs von einer raschen Eliminierung von Hämagglutinin (bzw. Hämolysin) aus dem Blutkreislauf des Versuchstieres zu sprechen (ähnlich wie bei einem spezifischen Antigen-Antikörperkomplex), doch dürfte es sich hierbei nicht um eine Entfernung bzw. einen Abbau von Hämagglutinin-Diphthin-Komplexen handeln, sondern vielmehr um eine Eliminierung des $^{d1}\text{F(ab)}_2$ -Fragments, das bei der vorausgegangenen (in vitro oder in vivo) Inkubierung entstand. Diese Deutung ist umso wahrscheinlicher, da SPIEGELBERG und WEIGLE (1964) nachgewiesen haben, daß nach Injektion von radio-markierten (J^{131}) Papain- und Pepsinfragmenten aus homologen und heterologen Seren bei Kaninchen, Meerschweinchen und Maus

die 5S-Pepsinfragmente und Fab-Papainfragmente sehr rasch mit dem Urin ausgeschieden werden, während die Fc-Papainfragmente etwa die gleiche intravitale Halbwertszeit besitzen wie das entsprechende native IgG-Globulin.

V. Zusammenfassung

=====

Es wurde das aus Diphtherierohtoxin isolierte atoxische, hitzestabile und intravital wirksame Polypeptid Diphthin auf seine Spaltwirkung gegenüber reinem IgG-Globulin aus Normal- und Immunseren vom Mensch und Kaninchen mittels Gelfiltration und chemischer, agar- und immunoelektrophoretischer sowie serologischer Verfahren untersucht und die Resultate mit der Spaltwirkung von Papain und Pepsin verglichen. Hierbei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Reaktionskinetische Befunde sprechen dafür, daß es sich beim Diphthin um eine Proteinase handelt.

2. Nach Diphthinbehandlung von IgG-Globulin vom Mensch und Kaninchen resultieren zwei Fragmente, von denen das größere ($^{di}F(ab)_2$) angenähert dem 5S-Pepsinfragment und das kleinere (^{di}Fc) weitgehend dem Papainfragment Fc entspricht. Hinsichtlich des proteolytischen Effekts nimmt somit Diphthin eine Mittelstellung zwischen Pepsin und Papain ein.

3. Das Diphthinfragment $^{di}F(ab)_2$ besitzt, genau wie das vergleichbare 5S-Pepsinfragment, die Aktivität kompletter Antikörper, wobei die Fähigkeit zur Komplementbindung fehlt.

4. Geringgradige Unterschiede im Aminosäuregehalt (bestimmt mittels eines Aminosäuren-Analysators) der Diphthin- und Papainfragmente dürften teils methodisch, teils durch die Heterogenität der IgG-Globuline oder durch eine bei beiden Fermenten leicht differierende Molekülsplaltung bedingt sein.

5. Die bei den Papain-, Pepsin- und Diphthinfragmenten von IgG-Globulin differierenden Molekulargewichte und Kohlenhydratgehalte lassen vermuten, daß durch Diphthin das IgG-Globulin vom Mensch und Kaninchen in einem Molekülbereich gespalten wird, der beiderseits durch die von Papain bzw. Pepsin bewirkten Spaltlinien begrenzt ist.

6. Bei Zusatz von Cystein erfolgt bei der Diphthinbehandlung von IgG-Globulin vom Mensch und Kaninchen eine Halbierung der Antikörperaktivität besitzenden $^{di}F(ab)_2$ -Fragments zu zwei ^{di}Fab -Bruchstücken. Dieses Fragment ist mit dem 3,5S-Pepsin-Cystein-Fragment und dem Papainfragment Fab weitgehend identisch und besitzt wie diese nur noch die Aktivität inkompletter bzw. "univalenter" Antikörper.

7. Eine Kontamination der geprüften Diphthinchargen mit Neuraminidase ist für den diphthinbedingten Spalteffekt offensichtlich bedeutungslos.

8. Die erhaltenen Befunde gestatten eine neue Deutung des von SEERMÜLLER beschriebenen und von SCHIFF als Diphthin-effekt geklärten tierexperimentellen Hämolyseschutz-Phänomens.

VI. Literatur

=====

- BLUMBERG, B.S. und WARREN, L. (1961): The effect of sialidase on transferrins and other serum proteins.
Biochim.Biophys.Acta 50, 90.
- Bull. World Health Org. (1964) 30, 447.
- CEBRA, J.J., GIVOL, D., SILMAN, H.J. und KATCHALSKI, E. (1961):
A two-stage cleavage of rabbit γ -globulin by a water-insoluble papain preparation followed by cysteine.
J.Biol.Chem. 236, 1720.
- COHEN, S. und PORTER, R.R. (1964): Structure and biological activity of immunoglobulins. In: Advances in Immunology 4, 287-349.
Academic Press, London und New York.
- CRUMPTON, M.J. und WILKINSON, J.M. (1963): Amino acid compositions of human and rabbit γ -globulins and of the fragments produced by reduction.
Biochem.J. 88, 228.
- DEUTSCH, H.F., STIEHM, E.R. und MORTON, J.J. (1961):
Action of papain on human serum globulins.
J.Biol.Chem. 236, 2216.
- EDELMAN, G.M. (1959): Dissociation of γ -globulin.
J.Am.Chem.Soc. 81, 3155.
- EDELMAN, G.M., HEREMANS, J.F., HEREMANS, M.Th. und KUNKEL, H.G. (1960): Immunological studies of human γ -globulin.
J.Exp.Med. 112, 203.
- EDELMAN, G.M. und POULIK, M.D. (1961): Studies on structural units of the γ -globulins.
J.Exp.Med. 113, 861.

- EDELMAN, G.M. und GALLY, J.A. (1962): The nature of Bence-Jones proteins.
J.Exp.Med. 116, 207.
- FAHEY, J.L. (1962): Heterogeneity of γ -globulins.
In: Advances in Immunology 2, 41-109.
Academic Press, London und New York.
- FLEISCHMAN, J.B., PAIN, R.H. und PORTER, R.R. (1962):
Reduction of γ -globulins.
Arch.Biochem.Biophys., Suppl. 1, 174.
- FLEISCHMAN, J.B., PORTER, R.R. und PRESS, E.M. (1963): The
arrangement of peptide chains in γ -globulin.
Biochem.J. 88, 220.
- FRANKLIN, E.C. (1960): Structural Units of Human 7S Gamma
Globulin.
J.Clin.Invest. 39, 1933.
- FRANKLIN, A. (1964): The immune globulins. - Their structure
and function and some techniques for their
isolation.
Progr.Allergy 8, 58-148.
- FUDENBERG, H., MANDY, W.J. und NISONOFF, A. (1962): Serologic
studies of proteolytic fragments of rabbit
agglutinating antibodies.
J.Clin.Invest. 41, 2123.
- FUDENBERG, H.H., GOODMAN, J.W. und MILGROM, F. (1964): Immuno-
chemical studies on rabbit anti-antibody.
J.Immunol. 92, 227.
- GOODMAN, J.W. (1964): Immunologically active fragments of
rabbit gamma globulin.
Biochem. 3, 857.
- GOLD, E.R. und HOLLÄNDER, L.P. (1966): Gammaglobuline und
Immunglobuline. In: Ergebnisse der Mikro-
biologie, Immunitätsforschung und experimen-
tellen Therapie 39, 108-145.
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York

- HANSON, L.A. und JOHANSSON, B.G. (1963): Isolation of immunologically active fragments of normal human γ -globulin after tryptic degradation.
Clin.Chim.Acta 8, 66-78.
- HEIDE, K. und HAUPT, H. (1962): Über die Neuraminidase aus Diphtherie-Toxin.
Naturwissenschaften 1, 15.
- HOLT von, C. (1954): Eine Methode zur Bestimmung des neutralen Hexoseanteiles der Proteine des Bluteserums.
Klin.Wschr. 32, 661.
- HSIAO, Sh.-H. und PUTNAM, F.W. (1961): The cleavage of human γ -globulin by papain.
J.Biol.Chem. 236, 122.
- JAMIESON, G.A. und POULIK, M.D. (1962): Neuraminidase of diphtheria toxin.
Fed.Proc. 21, 230.
- KARUSH, F. (1959): Properties of papain-digested purified antihapten antibody.
Fed.Proc. 18, 577.
- MANDY, W.J., RIVERS, M.M. und NISONOFF, A. (1961): Recombination of univalent subunits derived from rabbit antibody.
J.Biol.Chem. 236, 3221.
- MOORE, S. und STEIN, W.H. (1951): Chromatography of amine acids on sulfonated polystyrene resins.
J.Biol.Chem. 192, 663.
- MOORE, S., SPACKMAN, D.H. und STEIN, W.H. (1958): Chromatography of amine acids on sulfonated polystyrene resins.
Anal.Chem. 30, 1190.
- MORRIS, D.L. (1948): Quantitative determination of carbohydrate with Dreywood's anthrone reagent.
Science 107, 254.

- MÜLLER-EBERHARD, H.J. und KUNKEL, H.G. (1956): The carbohydrate of γ -globulin and myeloma proteins. *J.Exp.Med.* 104, 253.
- MÜLLER-EBERHARD, H.J. und KUNKEL, H.G. (1956): Two types of γ -globulin differing in carbohydrate content. *Proc.Soc.Exper.Biol.Med.*, N.Y. 93, 146.
- NISONOFF, A., WISSLER, F.C. und WOERNLEY, D.L. (1959): Mechanism of formation of univalent fragments of rabbit antibody. *Biochem.Biophys.Research.Communs.* 1, 318.
- NISONOFF, A., WISSLER, F.C., LIPMAN, L.N. und WOERNLEY, D.L. (1960): Preparation of univalent fragment from the bivalent rabbit-antibody molecule by reduction of disulfidbond. *Arch.Biochem.Biophys.* 89, 230.
- NISONOFF, A. und DIXON, D.J. (1964): Evidence for linkage of univalent fragments or half-molecules of rabbit γ -globulin by the same disulfide bond. *Biochem.* 9, 1338.
- NOELKEN, M.E., NELSON, Ch.A., BUCKLEY, C.E. und TANFORD, Ch. (1965): Gross conformation of rabbit 7S -immunoglobulin and its papain-cleaved fragments. *J.Biol.Chem.* 240, 218.
- PALMER, J.L. und NISONOFF, A. (1964): Dissociation of rabbit γ -globulin into half-molecules after reduction of one labile disulfide bond. *Biochem.* 3, 863.
- PORATH, J. und FLODIN, P. (1959): Gelfiltration, a method for desalting and group separation. *Nature* 183, 1657.
- POPENOE, A. und DREW, R.M. (1957): The action of an enzyme of *Clostridium perfringens* on orosomucoid. *J.Biol.Chem.* 228, 673.
- PORTER, R.R. (1959): The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem.J.* 73, 119.

- PORTER, R.R. (1962): In: Symposium on "Basis Problems in Neoplastic Disease", S. 177.
Herausgeber: A. GELLHORN und E. HIRSCHBERG,
Columbia University Press, New York.
- PORTER, R.R. und PRESS, E.M. (1962): Immunochemistry.
Annual Rev.Biochem. 31, 625.
- PORTER, R.R. (1964): Structure of antibodies. In: Protides
of the biological fluids. (Proc. 11. colloqu.,
Bruges, 1963), S. 11.
Elsevier Publ.Company, Amsterdam, London,
New York.
- PRESS, E.M. und PORTER, R.R. (1962): Isolation and characteri-
sation of fragments of human serum-albumin con-
taining some of the antigenic sites of the
whole molecule.
Biochem.J. 83, 172.
- POULIK, M.D. (1956): Tests of purity of diphtheria toxins
by electrophoresis in starch gel.
Nature 177, 982.
- POULIK, M.D. (1957): Starchgel electrophoresis in a dis-
continuous system of buffers.
Nature 180, 1477.
- POULIK, M.D. und SMITHIES, O. (1958): Comparison and combi-
nation of the starch-gel and filterpaper
electrophoretic methods applied to human sera:
Two dimensional electrophoresis.
Biochem.J. 68, 636.
- POULIK, M.D. (1961): Interaction of transferrin, haptoglobin
and other serum proteins with neuraminidase
of diphtheria-toxin.
Clinic.Chim.Acta 6, 493.
- POULIK, M.D. (1963): Electrophoretic map of chemically derived
subunits of papain-digested γ -globulin.
Nature 198, 752.

- PUTNAM, F.W., HSIAO, Sh. und TAN, M. (1960): Papain cleavage of human and rabbit γ -globulins.
Fed.Proc. 19, 77.
- RADIN, N.S., LAVIN, F.B. und BROWN, J.B. (1955): Determination of cerebrasides.
J.Biol.Chem. 217, 789.
- ROSEVEAR, J.W. und SMITH, E.L. (1961): I. Isolation and properties of glycopeptides from a fraction of human γ -globulin.
J.Biol.Chem. 236, 425.
- SCHIFF, W. (1961): Untersuchungen zum Seemüller-Phänomen.
Z.Immun.forsch. 122, 79.
- SCHIFF, W. (1961): Über einen in vivo wirksamen antihämolytischen Schutzstoff ("Diphthin") aus Corynebakterien.
Path.Microbiol. 24, 299.
- SCHIFF, W. (1964a): Über den Hämagglutininbindungsmechanismus des Hämolyse-schutzstoffes Diphthin.
Z.Immun.forsch. 127, 266.
- SCHIFF, W. (1964b): Über den intravitalen Hämagglutininhemmungs-Mechanismus von Diphthin.
Z.Immun.forsch. 127, 269.
- SCHIFF, W. (1964c): Zur Frage der Bindung zwischen Diphthin und Diphtherie-Antitoxin ("Anti-Diphthin").
Z.Immun.forsch. 127, 400.
- SCHIFF, W. (1964d): Physikalisch-chemische und immunologische Eigenschaften von gereinigtem Diphthin.
Z.Immun.forsch. 127, 479.
- SCHIFF, W. (1965): Immunoelktrophoretische Auftrennung von Serumglobulinen mittels Diphthin.
Zbl.Bakt. I Orig. 198, 261.
- SCHIFF, W. und WEISE, H.-Chr.: noch unveröffentlicht.
- SCHULTZE, H.E. und SCHWICK, G. (1957): Immunchemischer Nachweis von Proteinveränderungen unter besonderer Berücksichtigung fermentativer Einwirkungen auf Glyko- und Lipoproteine, immunoelktrophoretische Studien. Behringwerk-Mitt. 33, 11.

- SCHULTZE, H.E. und HEREMANS, J.F. (1966): Analytical methods in protein chemistry. In: Molecular Biology of Human Proteins 1, 121.
Elsevier Publ.Company, Amsterdam - London - New York.
- SEEMÜLLER, H. (1943): Über ein paradoxes serologisches Phänomen: "Giftiges Serum wird durch Zusatz von Gift ungiftig".
Schweiz.Z.Path.Bakt. 6, 335.
- SEEMÜLLER, H. (1945): Über drei neue serologische Phänomene: Das Dissociations-, das Varianten- und das Blockade-Phänomen zum experimentellen Nachweis der Bindung des Hämagglutinins durch das Diphtherie-Toxin bzw. -Anatoxin.
Schweiz.Z.Path.Bakt. 8, 503.
- SEEMÜLLER, H. (1954): Über die Bindung zwischen Hämagglutinin und Diphtherie-Toxin.
Z.Immun.forsch. 111, 485.
- SOBER, H.A. und PETERSON, E.A. (1958): Protein chromatography on ion exchange cellulose.
Fed.Proc. 17, 1116.
- SPIEGELBERG, H.L. und WEIGLE, W.O. (1965): The catabolism of homologous and heterologous 7S gamma globulin fragments.
J.Exp.Med. 121, 323.
- STEOS, P., TADZINSKI, G. und PRESSMAN, D. (1962): Heterogeneity of rabbit-antibody fragments.
J.Immunol. 88, 572.
- STÖRIKO, K. (1964): Die Protein-Kohlehydrat-Bindung in Glykoproteinen.
Behringwerk-Mitt. 43, 195.
- TARANTA, A., WEISS, H.S. und FRANKLIN, E.C. (1961): Complement fixation by antibody fragments.
Science 134, 1981.

- TRISTRAM, G.R. und SMITH, R.H. (1963): Amino acid composition of certain proteins. In: The Proteins, Composition, Structure and Function 1, 45.
Herausgeber: NEURATH, H.
Academic Press, New York und London.
- URIEL, J. (1960): Les réactions de caractérisation des constituants protéiques après électrophorèse on immuno-électrophorèse en gélose, S. 41. In: Analyse Immunoélectrophorétique.
Herausgeber: GRABAR, P. und BURTIN, P.
Masson et C^{ie}, Paris.
- UTSUMI, S. und KARUSH, F. (1964): The subunits of purified rabbit antibody.
Biochem. 3, 1329.
- WARREN, L. und SPEARING, C.W. (1963): Sialidase (Neuraminidase) of *Corynebacterium Diphtheriae*.
J.Bacteriol. 86, 950.
- WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O. und BISTER, F. (1952): Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser.
Z.Naturforsch. 76, 148.

Herrn Professor Dr. med. R. Siegert bin ich für die mir in seinem Institut zur Verfügung gestellte Arbeitsmöglichkeit zu großem Dank verpflichtet.

Besonders danke ich Herrn Privat-Dozent Dr. med. W. Schiff für die Überlassung des Themas und seine ständige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 9.1.1938 wurde ich, Heinrich Müller, als drittes Kind des Handwerkermeisters Hubert Müller und seiner Ehefrau Antonie geb. Henell in Olpe/Westf. geboren. Ich habe 5 Geschwister. Ab Herbst 1945 besuchte ich bis zum Frühjahr 1951 die Volksschule in Olpe. Mit 13 Jahren kam ich auf das Knabenseminar Liborianum in Paderborn. Ab Ostern 1952 besuchte ich das Städt. Neusprachliche Gymnasium in Olpe und bestand dort am 12.3.1959 das Abitur. Im Januar 1958 starb mein Vater. Deshalb habe ich nach dem Abitur zur Unterstützung meiner Mutter und jüngeren Geschwister 1 1/4 Jahr in einer Rohrfabrik gearbeitet. Im Sommersemester 1960 begann ich das Medizinstudium an der Philipps-Universität Marburg. Am 22.4.1963 legte ich dort das Physikum ab und am 17.3.1967 ebenfalls in Marburg das Medizinische Staatsexamen mit der Note "gut". Vom 15.4.1967 bis 15.11.1967 war ich Medizinalassistent am Hygiene-Institut der Universität Marburg.

Marburg/Lahn, den 17. November 1967

Heinz Müller

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Herren
Professoren und Dozenten:

Beckmann, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Brück,
Buchholz, Bücher, Dimroth, Drawert, du Mesnil de
Rochemont, Exner, Gedigk, Golenhofen, Hamm, Hart-
mann, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Huber, Jacob,
Lang, Linneweh, Löhr, Mann, Mahr, Martini, Maurath,
Marx, Neubauer, Niessing, Oehmig, Overbeck, Petry,
Rohen, Salfeld, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmitz,
Schölmerich, Schwaiger, Seidel, Siegert, Spiegel-
berg, Straub, Streicher, Voigt, Walcher, Würterle.

